

INVESTIGACIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS CABEZA DE SERIE DE PROCEDENCIA NATURAL

Víctor Tena Pérez

Directores:

Ángel Rumbero Sánchez

Montserrat Ortega Doménech

AGRADECIMIENTOS.

Aunque la definición de tesis es, "la realización de un trabajo original de investigación realizado por un estudiante", afirmar esto, sería estar faltando a la verdad por mi parte. Porque, si bien, el volumen que tiene ahora mismo entre sus manos es un trabajo original de investigación, no hubiese sido posible sin todo el apoyo recibido durante la realización. Considero que he tenido la suerte de conocer a lo largo este viaje, a gente excepcional, que de una manera u otra han marcado el devenir de mi vida, tanto a nivel intelectual como personal. Sería necesario un segundo volumen para agradecer a todo el mundo, pero intentaré que quede reflejado en un par de páginas.

Llegaron al laboratorio 202 al poco de haber aterrizado en la UAM, para 6 meses, los cuales se convirtieron en 4 años. Sin embargo, nada hubiese sido igual sin ellos, los mariolitos. Muchas gracias a **Mariola**, por ayudar siempre y su buen temperamento. A **Parra**, doctor no solo de química, si no de la vida en general. Gracias a **Aurora** y **Laura**, por todos los grandes momentos vividos, y los churros para desayunar en San Ginés. Gracias a **Vitorino**, mi tocayo, por compartir sus experiencias y las grandes comilonas de los sábados, si no te haces tú camino en la química, siempre podrás ser chef. A **Jarava**, por todas las vivencias y el frikismo compartido, una de las personas más nobles que he podido conocer. A **Trulli**, nuestra italiana, símbolo de esfuerzo como nadie. Gracias a **Tim**, por acogerme, tanto en su laboratorio como en su familia, haciéndome sentir como un miembro más.

Muchas gracias a todos los Valoralios, ellos son conscientes del esfuerzo que ha llevado este trabajo, y siempre han mostrado su apoyo incondicional. A **Francisco**, impulsor de la empresa, por hacernos creer que sólo unos pocos, podríamos llegar donde quisiéramos. A **Marisol**, por saber remar en la adversidad. A **Jesús**, por su capacidad de contagiar a todo el mundo positivismo y alegría. A **Santi** y **Diego**, porque la verdad, sin sus cultivos no habría material para esta tesis (literalmente).

A **Montse**, mucho más que una co-directora, una amiga que espero pueda durar por muchos años. Confidente y bastón de apoyo para andar el camino, una de esas personas que todos deberíamos tener en nuestra vida.

Ahora toca pasar a la gente del laboratorio 202, el cual me gusta ver como la aldea de los irreductibles galos, pero en lugar de Astérix, de Ángel Rumbero. Gracias a **Ángel** por haberme acogido de tan buen grado desde el minuto cero y haber confiado plenamente en mí. Por su apoyo y conocimiento, que sirvió como faro para este trabajo.

Me gustaría agradecerle también a mis TFGs, especialmente a los **Javis** y a **Eva**. Porque creo que algo logré enseñarlos (no sé si bueno o malo), pero yo aprendí mucho de ellos. A los "basurillas"; **Álex**, **Óscar** y **Nuria**. Porque la relación a pesar de corta, fue intensa. Tres personas maravillosas a las que espero que las vaya genial en la vida.

Agradecimiento muy especial a **Luis Apaza**, un trabajador nato, capaz de pasar una noche sin dormir para poder recoger resultados. He sido muy afortunado de conocer a alguien como tú, y aunque el futuro parece incierto, sé que cogerás el viento favorable para llegar a buen puerto.

Alfredo, ¿qué voy a decir de ti? Poco hay que decir que no sepas, 12 años han pasado codo a codo, para mí, más que un amigo eres un hermano. No te puedo reprochar nada, porque siempre has estado ahí cuando lo he necesitado. Me tienes para cualquier cosa que necesites en la vida.

A **Leticia**, porque la distancia es solo un número, y aun estando lejos sé que siempre estás a mi lado. Me has aguantado en los momentos más difíciles, regalándome siempre buenas palabras y tu sonrisa. Eso es impagable, pero espero al menos compensarlo estando más cerca de ti.

Gracias a mi cuñado **Jesús**, mi hermana **Nuria** y la nueva peque de la familia, **Alma**. Porque verlos felices me ha insuflado más ánimo del que se pueden imaginar, y la felicidad os la merecéis más que nadie.

Gracias a mi abuelo **Pedro** y a **Lola**, que me han enseñado que la edad no importa, que cada día es un regalo, y hay motivos para levantarse y disfrutar. Que aunque la vida te golpee, hay que levantarse y seguir hacia delante.

Finalmente, gracias a mis padres, **Marcelino** y **Victoria**. Por cómo me han cuidado durante toda mi vida. Sé que muchas veces no he sido el mejor hijo, pero yo quiero que sepan que no me puedo sentir más orgulloso de ellos como padres. Siempre se dice que un hijo es un regalo, pero en mi caso, creo que he sido al revés teniéndolos a ellos como padres.

Falta mucha gente a la que me gustaría agradecer, pero creo que ya me he alargado suficiente. A todas las personas que han formado parte de esta etapa, no sé si nuestros caminos continuarán a la par o se separarán, pero os deseo a todos lo mejor.

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| Ac ₂ O | Anhídrido acético |
| ACP | Proteína transportadora de ácidos grasos |
| ADME | Absorción, distribución, metabolismo y excreción |
| AIE | Antiinflamatorio esteroideo |
| AINE | Antiinflamatorio no esteroideo |
| ALT | Alanina aminotransferasa |
| AP1 | Factor de transcripción |
| AZT | Azidotimidina |
| CC ₅₀ | Concentración citotóxica al 50% |
| CEPT | Proteína colesterol éster transferasa |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| COSY | Correlated spectroscopy |
| COX | Ciclooxigenasa |
| DCC | N,N'-diciclohexilcarbodiimida |
| DGDG | Digalactosil diacil glicerol |
| DMAP | 4-dimetilaminopiridina |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo |
| EGFR | Receptor del factor de crecimiento epidérmico |
| Et ₃ N | Trietilamina |
| FAAH | Enzima ácido graso hidrolasa |
| FDA | Administración de alimentos y medicamentos |
| GC | Cromatografía de gases |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| HG | Heterocisto glicolípido |
| HGB | Hemoglobina |
| HMQC | Heteronuclear multiple-quantum correlation |
| HSQC | Heteronuclear single-quantum correlation |
| HTS | Cribado farmacológico de alto rendimiento |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria al 50% |
| IL | Interleucina |

| | |
|--------------------|--|
| IND | Investigational new drug |
| JAK | Quinasa Janus |
| LiAlH ₄ | Hidruro de litio y aluminio |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LMC | Leucemia mieloide crónica |
| LTR | Repetición terminal larga |
| LYM | Linfocitos |
| MGDG | Monogalactosil diacil glicerol |
| MGlcDG | Monoglucosil diacil glicerol |
| MS | Espectrometría de masas |
| NaBH ₄ | Borohidruro sódico |
| NF-κB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| NFAT | Factor nuclear de células T activadas |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| PBMC | Célula mononuclear de sangre periférica |
| PN | Producto natural |
| RBC | Glóbulos rojos |
| SIDA | Síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| SOCl ₂ | Cloruro de tionilo |
| SP1 | Factor de transcripción |
| STAT3 | Transductor de señal y activador de transcripción 3 |
| THF | Tetrahidrofurano |
| THP-1 | Línea celular monocítica humana |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral |
| TOCSY | Totally correlated spectroscopy |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humana |
| VSV | Virus de la estomatitis vesicular |
| WBC | Glóbulos blancos |

RESUMEN

Los productos naturales han servido como inspiración para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos desde el inicio de la farmacología. Aunque hubo un receso por parte de la industria farmacéutica en el desarrollo de este tipo de moléculas, durante la década de 1990 y principio del nuevo milenio, el tiempo ha demostrado que los productos naturales continúan siendo moléculas excepcionales para el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticamente relevante, tanto por el espacio químico que ocupan como por su especificidad sobre las dianas biológicas.

Esta tesis representa la continuación de la investigación y trabajo previo realizado tanto por el grupo de productos naturales de la UAM como por la empresa Valoralia I más D para el aislamiento, elucidación y modificación estructural de metabolitos secundarios como potenciales cabezas de serie.

En el primer capítulo, se ha estudiado la composición de la cianobacteria *Dolichospermum* sp. y se han aislado e identificados los metabolitos secundarios previamente descritos: *feofitina A* (**22**), *13²-hidroxi-feofitina A* (**23**), *MGDG* (**28 y 29**), *DGDG* (**30 y 31**), *HG* (**32**) y *DGDG* (**33 y 34**); sobre los cuales se determinó su actividad biológica antioxidante, antiinflamatoria y regenerativa de la piel. Se ha identificado por primera vez *1-(4,6-dipentil-5,6-dihidro-2H-1,2,3-oxadiazin-2-il)-3-hidroxiopropan-1-ona* (**24**) en esta especie y se han sintetizado sus análogos sintéticos (**26**) y (**27**). Tanto el producto **24** como sus derivados han mostrado actividad antitumoral, anti-VIH, anti-oxidante y anti-inflamatoria en el rango de nM sobre ensayos *in vitro*. Se ha demostrado la seguridad toxicológica de la molécula **24** sobre un modelo animal de ratones *in vivo*.

En el segundo capítulo, se investigó el extracto de la cianobacteria *Cylindrospermum* sp.; de esta cepa se aislaron e identificaron el carbamidociclofano **A** (**1**) y **F** (**2**), previamente conocidos. Se ha determinado la configuración absoluta del carbamidociclofano **A** mediante difracción de rayos X, la cual no había sido reportada con anterioridad. Se ha caracterizado el carbamidociclofano **V** (**3**), el cual no se había hallado antes en la naturaleza. Se ha elucidado el carbamidocilindrofridino **A** (**4**) como un nuevo metabolito secundario relacionado con la familia de los carbamidociclofanos en cianobacterias, este producto demuestra experimentalmente que en la familia de los carbamidociclofanos, la incorporación de los cloros terminales en la cadena alquílica y los grupos carbamoilo ocurre previamente a la etapa de macrociclación. Todos los compuestos aislados mostraron actividad citotóxica a diferentes niveles, si bien, la ausencia de sustitución en el C-1 de los carbamidociclofanos disminuye la actividad citotóxica exhibida por los mismos.

En el tercer capítulo, se llevó a cabo un estudio de relación estructura-actividad antiinflamatoria de análogos de macamidas, aisladas previamente de Mashua (*Tropaeolum turerosum*), sobre la diana TNF- α . Se confirmó que el alargamiento de la cadena alifática y la introducción de dobles enlaces, mejora la actividad inhibitoria sobre TNF- α , cuyo resultado queda plasmado en la actividad de los productos **9** y **14**. La introducción en un metilo en la posición bencílica (**21**), mejora significativamente la actividad biológica. La quiralidad del metilo resulta un factor clave en la relación estructura-actividad, observándose una gran

afinidad de la diana por el enantiómero R. La sustitución del enlace amida por un enlace éster (**38**), tioéter (**39**), amina (**40**) o tioamida (**41**), produce un efecto positivo sobre la inhibición de TNF- α . La introducción de sustituyentes en el anillo aromático genera una mejoría de la actividad biológica, siendo la disustitución *meta* con grupos metilo la más activa, como refleja la molécula **64**. Tras llevar a cabo la optimización, se confrontó el mejor candidato obtenido, **78**, al antiinflamatorio ibuprofeno y se determinó que el mecanismo inhibitorio mostrado por las macamidas es diferente al de los AINE encontrados hasta el momento.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción general..... | 1 |
| 1.1 Descubrimiento de fármacos: evolución..... | 2 |
| 1.1.1 Época pre-helénica..... | 2 |
| 1.1.2 Grecia y Roma..... | 3 |
| 1.1.3 Periodo árabe..... | 3 |
| 1.1.4 El descubrimiento de américa..... | 3 |
| 1.1.5 Siglo XIX..... | 4 |
| 1.1.6 Siglo XX..... | 7 |
| 1.1.6.1 Hormonas..... | 8 |
| 1.1.6.2 Agentes antibióticos..... | 9 |
| 1.1.6.3 Agentes antitumorales..... | 10 |
| 1.1.6.4 Agentes cardiovasculares: estatinas..... | 12 |
| 1.1.6.5 Agentes antivirales..... | 13 |
| 1.2 Etapas en el desarrollo de nuevos fármacos..... | 15 |
| 1.2.1 Selección de una diana..... | 17 |
| 1.2.2 Descubrimiento de un cabeza de serie..... | 18 |
| 1.2.3 Los productos naturales en el descubrimiento de fármacos..... | 19 |
| 1.2.4 Optimización de un cabeza de serie..... | 20 |
| 1.2.5 Fase preclínica..... | 22 |
| 1.2.6 Fase clínica I..... | 22 |
| 1.2.7 Fase clínica II..... | 22 |
| 1.2.8 Fase clínica III..... | 23 |
| 1.2.9 Fase clínica IV..... | 23 |
| 1.3 Necesidad de nuevos agentes terapéuticos y el porqué de esta tesis doctoral. | 23 |
| | |
| 2. Estudio de la cianobacteria <i>Dolichospermum</i> sp. (GTBC-218)..... | 26 |
| 2.1 Introducción..... | 27 |
| 2.1.1 Diversidad y adaptabilidad de las cianobacterias..... | 27 |
| 2.1.2 Cianobacterias extremófilas..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.1.3 Aplicaciones no terapéuticas de las cianobacterias..... | 30 |
| 2.1.4 Aplicaciones terapéuticas de las cianobacterias..... | 32 |
| 2.1.5 Valoración ImásD..... | 36 |
| 2.2 Objetivos..... | 37 |
| 2.3 Resultados y discusión..... | 37 |
| 2.3.1 Estudios preliminares de la cepa GTBC-218..... | 37 |
| 2.3.2 Fraccionamiento del extracto EO-218..... | 38 |
| 2.3.3 Análisis de la fracción EO-218 A..... | 38 |
| 2.3.3.1 Fracción EO-218 A-I..... | 38 |
| 2.3.3.2 Fracción EO-218 A-II..... | 40 |
| 2.3.4 Análisis de la fracción EO-218 B..... | 42 |
| 2.3.4.1 Determinación estructural de EO-218 B-II (22)..... | 42 |
| 2.3.4.2 Determinación estructural de EO-218 B-IV (23)..... | 45 |
| 2.3.4.3 Actividad biológica <i>in vitro</i> | 46 |
| 2.3.5 Análisis de la fracción EO-218 C..... | 48 |
| 2.3.5.1 Determinación estructural de EO-218 C-III..... | 48 |
| 2.3.5.2 Estudio de la estereoquímica en C-6..... | 54 |
| 2.3.5.3 Preparación de derivados del compuesto 24 | 55 |
| 2.3.5.4 Síntesis del análogo 27 | 56 |
| 2.3.6 Estudio de la actividad biológica..... | 57 |
| 2.3.6.1 Actividad biológica <i>in vitro</i> | 57 |
| 2.3.6.2 Actividad biológica <i>in vivo</i> | 62 |
| 2.3.7 Análisis de la fracción EO-218 D..... | 66 |
| 2.3.7.1 Determinación estructural del EO-218 D-II (28 y 29)..... | 68 |
| 2.3.7.2 Determinación estructural de EO-218 D-III (30 y 31)..... | 69 |
| 2.3.7.3 Determinación estructural de EO-218 D-IV (32)..... | 70 |
| 2.3.7.4 Determinación estructural de EO-218 D-V (33 y 34)..... | 70 |
| 2.3.7.5 Actividad biológica..... | 71 |
| 2.4 Conclusiones..... | 72 |
| 2.5 Desarrollo experimental..... | 73 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5.1 Técnicas generales químicas..... | 73 |
| 2.5.2 Técnicas generales biológicas..... | 74 |
| 2.5.2.1 Ensayos <i>in vitro</i> | 74 |
| 2.5.2.2 Ensayos <i>in vivo</i> | 78 |
| 2.5.3 Colección y muestra de cultivo..... | 78 |
| 2.5.4 Extracción, fraccionamiento y aislamiento..... | 78 |
| 2.5.4.1 Fraccionamiento inicial..... | 78 |
| 2.5.4.2 Fraccionamiento de A..... | 79 |
| 2.5.4.3 Fraccionamiento de B..... | 80 |
| 2.5.4.4 Fraccionamiento de C..... | 80 |
| 2.5.4.5 Fraccionamiento de D..... | 81 |
| 2.5.5 Análisis de GC-MS..... | 82 |
| 2.5.6 Asignación estructural de metabolitos naturales por GC/MS..... | 84 |
| 2.5.7 Datos de RMN y HRESIMS..... | 91 |
| | |
| 3. Estudio de la cianobacteria <i>Cylindrospermum</i> sp (GTBC-360)..... | 98 |
| 3.1 Introducción..... | 99 |
| 3.1.1 El cáncer como enfermedad..... | 99 |
| 3.1.2 Tratamiento del cáncer y resistencia..... | 100 |
| 3.1.3 La ruta de señalización JAK/STAT..... | 103 |
| 3.2 Objetivos..... | 105 |
| 3.3 Resultados y discusión..... | 105 |
| 3.3.1 GTBC-360 estudios preliminares..... | 105 |
| 3.3.2 Fraccionamiento del extracto 360..... | 106 |
| 3.3.3 Determinación estructural de los metabolitos con actividad antitumoral.... | 106 |
| 3.3.3.1 Determinación de EO-360 A-V (1)..... | 106 |
| 3.3.3.2 Determinación de EO-360 A-IV (2)..... | 110 |
| 3.3.3.3 Determinación de EO-360 A-II (3)..... | 112 |
| 3.3.3.4 Determinación de EO-360 A-VI (4)..... | 115 |
| 3.3.4 Actividad citotóxica <i>in vitro</i> | 119 |

| | |
|--|----------------|
| 3.3.5 [n.n] ciclofanos y cilindrofidrinos en cianobacterias..... | 120 |
| 3.3.5.1 Estructura química..... | 120 |
| 3.3.5.2 Biosíntesis..... | 122 |
| 3.3.5.3 Actividad biológica..... | 125 |
| 3.4 Conclusiones..... | 126 |
| 3.5 Desarrollo experimental..... | 127 |
| 3.5.1 Técnicas generales químicas..... | 127 |
| 3.5.2 Técnicas generales biológicas..... | 128 |
| 3.5.3 Recolección de muestras y cultivo..... | 128 |
| 3.5.4 Extracción, fraccionamiento y aislamiento..... | 129 |
| 3.5.4.1 Fraccionamiento inicial..... | 129 |
| 3.5.4.2 Fraccionamiento de A..... | 129 |
| 3.5.5 Asignación estructural de metabolitos naturales..... | 130 |
| 4. Síntesis de análogos de macamidas naturales y estudio de actividad antiinflamatoria..... | 133 |
| 4.1 Introducción..... | 134 |
| 4.1.1 La inflamación..... | 134 |
| 4.1.2 Mediadores..... | 134 |
| 4.1.3 Inflamación e impacto social..... | 135 |
| 4.1.4 Antiinflamatorios..... | 135 |
| 4.1.5 Necesidad de nuevos agentes antiinflamatorios..... | 137 |
| 4.1.6 TNF- α | 137 |
| 4.1.7 Mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)..... | 138 |
| 4.1.8 Macamidas..... | 138 |
| 4.2 Objetivos..... | 139 |
| 4.3 Resultados y discusión..... | 140 |
| 4.3.1 Influencia de la cadena alquílica..... | 140 |
| 4.3.1.1 Síntesis de bencilamidas con distinta longitud de cadena..... | 140 |
| 4.3.1.2 Análisis de actividad biológica de bencilamidas con distinta longitud de cadena..... | 140 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.1.3 Síntesis de bencilamidas con distinto grado de insaturación en la cadena alquílica..... | 142 |
| 4.3.1.4 Análisis de actividad biológica de bencilamidas con distinto grado de insaturación en la cadena alquílica..... | 142 |
| 4.3.2 Influencia de la posición bencílica..... | 143 |
| 4.3.2.1 Síntesis de análogos sustituidos en la posición bencílica..... | 143 |
| 4.3.2.2 Análisis de actividad biológica de bencilamidas sustituidas en la posición bencílica..... | 144 |
| 4.3.2.3 Síntesis de derivados quirales..... | 145 |
| 4.3.2.4 Análisis de actividad biológica de los derivados quirales..... | 146 |
| 4.3.2.5 Síntesis de homólogos estructurales..... | 147 |
| 4.3.2.6 Actividad biológica de los homólogos estructurales..... | 147 |
| 4.3.3 Influencia del enlace amida..... | 148 |
| 4.3.3.1 Síntesis de análogos modificados en el enlace amida..... | 149 |
| 4.3.3.2 Actividad biológica de análogos modificados en el enlace amida..... | 150 |
| 4.3.4 Influencia del anillo aromático..... | 151 |
| 4.3.4.1 Síntesis de análogos modificados en el anillo aromático..... | 151 |
| 4.3.4.2 Actividad biológica de análogos modificados en el anillo aromático..... | 153 |
| 4.3.5 Optimización del cabeza de serie..... | 155 |
| 4.3.5.1 Síntesis de análogos optimizados..... | 156 |
| 4.3.5.2 Actividad biológica de los análogos optimizados..... | 157 |
| 4.3.5.3 Análisis del cabeza de serie frente a fármacos comerciales..... | 158 |
| 4.4 Conclusiones..... | 159 |
| 4.5 Desarrollo experimental..... | 160 |
| 4.5.1 Técnicas generales químicas..... | 160 |
| 4.5.2 Procedimiento general para la acilación de bencilaminas con ácidos grasos..... | 161 |
| 4.5.3 Síntesis de cloruro de linoleilo (15)..... | 162 |
| 4.5.4 Síntesis de N-fenillinoilhidrazida (16)..... | 163 |
| 4.5.5 Procedimiento general para la síntesis de linoleicamidas, linoleicoésteres y linoleicotioésteres..... | 163 |
| 4.5.6 Procedimiento general para la reducción de amidas..... | 171 |

| | |
|---|-----|
| 4.5.7 Procedimiento general para la obtención de tioamidas..... | 172 |
| 4.5.8 Procedimiento general para la síntesis de aminas..... | 173 |
| 4.5.9 Procedimiento general para la obtención del alcohol 74 | 175 |
| 4.5.10 Técnicas generales biológicas..... | 175 |

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS: EVOLUCIÓN

Históricamente, el hombre ha explorado la naturaleza para satisfacer la necesidad de alimentarse y aliviar el dolor causado por las enfermedades que lo atenazan. La búsqueda de remedios curativos ha estado fuertemente influenciada desde los albores de la humanidad por factores sociales y culturales, siendo la capacidad de comunicación la más destacable. Este hecho queda plasmado en los grandes éxitos de la medicina moderna, en la cual se tiene acceso, de manera rápida y universal, a la publicación de resultados científicos.

1.1.1 ÉPOCA PRE-HELÉNICA

El primer registro del que se tiene referencia escrita en el descubrimiento de fármacos data de hace 4000 años en Mesopotamia y Egipto. En Mesopotamia, ya se tiene constancia de la importancia en la utilización de las diferentes partes de las plantas medicinales para realizar los tratamientos.¹ En Egipto, el *papiro de Ebers* (figura 1a), detalla más de 800 prescripciones, de las que al menos un tercio han presentado propiedades farmacológicas y principios activos.² El Ayurveda (“ciencia y conocimiento de la vida”) es un compendio de la antigua India, donde aparecen referenciadas plantas alucinógenas, como cannabis, *Datura metel*, y otras como la serpaghanda, posteriormente, clasificada como *Rauwolfia serpentina* (figura 1b), que ha sido utilizada frente a la hipertensión. En 1950 se aisló la reserpina de la raíz de *Rauwolfia*, que mostró actividad antihipertensiva y sedativa.^{3,4} En China, desde la antigüedad, se siguen consumiendo diferentes remedios procedentes de plantas. El libro *Shen Nong Ben Cao Jing* (figura 1c) describe las características, el tratamiento y la prescripción de unas 250 medicinas. Este libro es considerado como la primera farmacopea, y cabe reseñar la *Ephedra sinensis*, de la cual se identificó y aisló el alcaloide efedrina.⁵

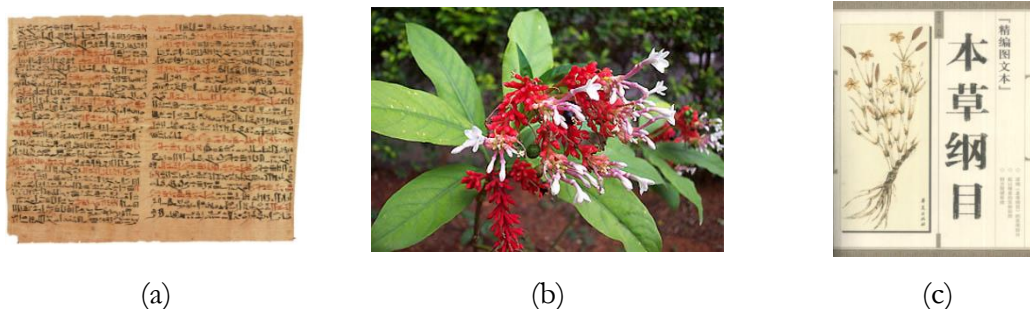


Figura 1. (a) Fragmento del papiro de Ebers. (b) *Rauwolfia serpentina*. (c) Fragmento del libro *Shen Nong Ben Cao Jing*.

¹ Thompson, R.C. *The Antiquaries Journal*. **1924**, 4, 431-433.

² Ebbel, G. *The Papyrus Ebers: The Greatest Egyptian Medical Document*, Levin & Munksgaard, Copenhagen.

³ Morgan, K. (1994) *Medicine of the Gods: Basic Principles of Ayurvedic Medicine*. Oxford, England. Mandrake.

⁴ Klohs, M. W.; Draper, M. D.; Keller, F.; Petrcek, F. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1381.

⁵ Way, L. E.; Yong, Q. L.; Fu-Chien, C. (1996). *Perspectives and Overview of Chinese Traditional Medicine and Contemporary Pharmacology in Progress in Drug Research*. En Varios Autores, *Progress in Drug Research* (pp. 132-161). Springer.

1.1.2 GRECIA Y ROMA

La medicina griega estuvo fuertemente influenciada por la egipcia, debido al intercambio cultural entre ambas civilizaciones.⁶ De las escuelas griegas despuntó la que se encontraba en la isla de Cos, que bajo la dirección de Hipócrates logró alcanzar una gran influencia en el mundo antiguo. Su libro *Hippocratic Corpus*, fue la base del conocimiento médico durante los siglos posteriores.⁷ En Roma, Dioscórides recopiló en *Materia Medica*, diferentes plantas y minerales que clasificó de acuerdo con sus propiedades médicas,⁸ el libro fue una referencia hasta el siglo XIX. Galeno, con su trabajo *Opera Omnia*, explicó numerosos remedios medicinales y su forma de utilización. En su obra cabe resaltar la prescripción específica de remedios en forma simple o mezclas complejas denominadas “galénicas” para cada tipo de enfermedad.⁹ Sus conocimientos lograron llegar hasta principios del siglo XIX.

En el siglo IV, tras el declive y caída del Imperio Romano, los centros culturales fueron transferidos al Imperio Bizantino y Arabia. En el oeste, Europa se sumió en una etapa de oscuridad donde la utilización de plantas y remedios se asoció con brujería.¹⁰

1.1.3 PERIODO ÁRABE

La invasión de los países mediterráneos por el Islam llevó a un intercambio de conocimientos entre el este (China, India y Persia) y el oeste, permitiendo el afloramiento de las distintas ciencias.¹¹

Entre los siglos VII y XIII, el mundo árabe disfrutó de su mayor época de esplendor. La farmacología árabe estuvo fuertemente influenciada por la griega, destacando, durante este periodo, grandes figuras científicas como Avicena y Abulcasis. Avicena fue un seguidor de la doctrina galénica, escribió *Canon Medicinæ* donde recopiló medicinas utilizadas en Grecia y Arabia. En este volumen describió el uso y la eficacia de unas 750 prescripciones ordenadas alfabéticamente. Abulcasis escribió la enciclopedia médica *al-Tasrif*, donde se explican procedimientos fisicoquímicos bastante rudimentarios como la destilación o la sublimación, así como, diferentes formulaciones farmacéuticas.¹²

1.1.4 EL DESCUBRIMIENTO DE AMÉRICA

El descubrimiento de América significó la incorporación de nuevas medicinas al arsenal terapéutico. Las primeras compilaciones no fueron llevadas a cabo por especialistas, sino por sacerdotes, políticos y militares. El primer documento editado de este tipo fue *Historia Medicinal de las Indias Occidentales*, escrito por el político Fernández de Oviedo y

⁶ Pearce, J. M. S. *Brain*. **2016**, 139, 2322-2325.

⁷ Jacques, J. (1999). *Hippocrates*. Translated by M.B. DeBevoise. Baltimore. Johns Hopkins University Press.

⁸ Gunther, R. (1959) *The Greek Herbal of Dioscorides*. New York. Hafner Publishing Co.

⁹ Galenus, C. (2001). *Opera Omnia*. Hildesheim. Georg Olms Verlag.

¹⁰ Minkowski, W. L. *Am. J. Public Health*. **1992**, 82, 288-295.

¹¹ Al-Rawi, S.; Feters, M. D. *Glob. J. Health Sci*. **2012**, 4, 164-169.

¹² Hamarneh, S. K. (2003) *Pharmacy and materia medica, in The Different Aspects of Islamic Culture, Vol. IV, part. II, Science and Technology in Islam*. Paris. Unesco.

publicado en Toledo el año 1622. Felipe II reconoció la trascendencia del descubrimiento del Nuevo Mundo y envió como heraldo a su doctor Francisco Hernández, en la que es considerada la primera expedición científica de la era moderna. El trabajo que realizó Hernández finalizó en el estudio de más de 4000 nuevas plantas.¹³

1.1.5 SIGLO XIX

Aunque en el Renacimiento ya se habían comenzado a poner en duda las convicciones aceptadas a lo largo de los siglos, es en el siglo XIX cuando comienza a ocurrir la revolución en el pensamiento humano y la concepción que se tiene de la naturaleza.

La mayoría de remedios utilizados antes de 1800 estaban preparados con extracciones de plantas en agua o agua/alcohol. Algunos de ellos eran altamente eficaces o tóxicos, pero ninguno exhibía las características químicas de lo que hoy en día es conocido como una medicina. La irrupción de la química y la biología como ciencias permitieron aislar, analizar y determinar la dosis de los principios activos presentes en las plantas.

Estos acontecimientos, junto con el avance de la química orgánica, inauguraron la carrera en el desarrollo de medicamentos. En 1806, Friederich Wilhelm Sertürner aisló la morfina (figura 2, I) a partir del opio, mediante extracciones ácido/base y cristalizaciones.¹⁴ En base al trabajo realizado por Sertürner, entre 1820 y 1850, comenzaron a aislarse metabolitos de diferentes plantas y a evaluarse su aplicación médica. Sobresale la emetina (figura 2, II), aislada en 1817 por el profesor Pierre Joseph Pelletier a partir de la raíz de *ippecacuana*. En 1820, Pelletier y Joseph Bienaimé Caventou obtuvieron la quinina (figura 2, III) como sulfato a partir de la corteza de la cinchona. En 1826, ambos colaboradores consiguieron 1800 kg de quinina en forma cristalina a partir de 150 toneladas de corteza, siendo el primer fármaco producido industrialmente.¹⁵

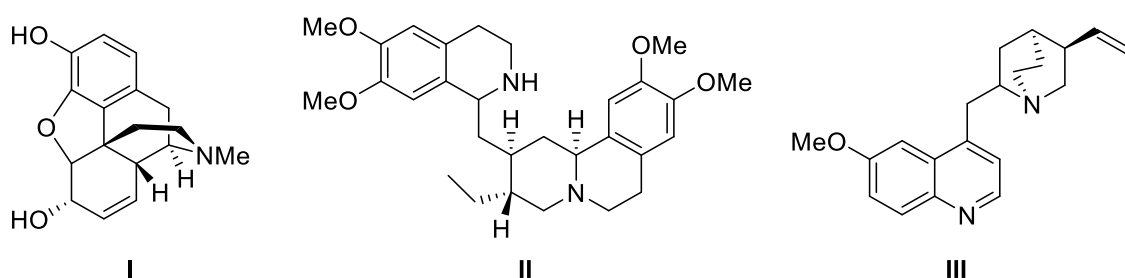


Figura 2. Estructura química de los primeros alcaloides purificados.

Muy pronto, empiezan a nacer industrias farmacéuticas por todo el continente europeo. Destaca la establecida por Emmanuel Merck en 1827, la cual comenzó siendo un pequeño laboratorio de extracción de alcaloides y otros principios activos que,

¹³ Arber, A. *Herbals. (1953). Their Origin and Evolution: A Chapter in the History of Botany.* Cambridge, UK. Cambridge University Press.

¹⁴ Sneader, W. (1986). *Drug Discovery: The Evolution of Modern Medicines.* Chichester, UK. Wiley.

¹⁵ Haas, L. F. J. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1994, 57, 1333.

posteriormente, ha evolucionado hasta convertirse en el gigante farmacéutico que representa hoy día.

Durante este siglo, no sólo se desarrollan los métodos para la extracción de plantas. La química sintética comienza a evolucionar rápidamente, sobre todo en la segunda mitad de siglo. La síntesis del cloral hidrato y sus análogos durante las décadas de 1870 y 1880, utilizados como anestésicos, sientan algunas de las bases más importantes en la investigación de fármacos.¹⁶

Es crucial en el desarrollo de medicamentos encontrar una molécula denominada *cabeza de serie*, que presente actividad farmacológica para posteriormente llegar a un compuesto terapéuticamente útil. El cabeza de serie suele exhibir efectos adversos inaceptables, que deberán ser modulados mediante la síntesis de derivados.¹⁷ Cuando son derivados de productos naturales se conocen como *productos semisintéticos*.¹⁸ En 1874 Alder Wright diacetiló la morfina dando lugar a la heroína (figura 3, **IV**), se pensó que podría evitar ciertos efectos secundarios observados en la morfina, si bien, a comienzos del siglo XX tuvo que ser retirada del mercado por su adicción.¹⁹ En 1880, Alfred Ladenburg añadió al núcleo de tropina el ácido mandélico, dando lugar al análogo homatropina (figura 3, **V**) que manifestaba un efecto analgésico más rápido que la morfina.¹⁹ En ambos casos, una modificación química simple conlleva un gran impacto en las consecuencias clínicas.

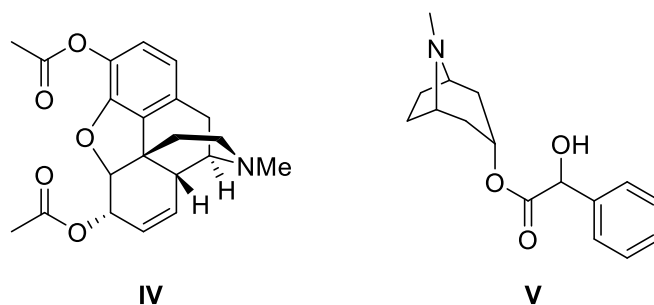


Figura 3. Análogos semisintéticos de alcaloides.

Aunque la química orgánica era un campo en expansión, las herramientas sintéticas de las cuáles se disponían a finales del siglo XIX eran limitadas. La mayoría de trabajos que se realizaban estaban limitados a la preparación de derivados de morfina o quinina. Los primeros productos totalmente sintéticos fueron Kairin® (figura 4, **VI**) y thallina (figura 4, **VII**), duraron poco tiempo en el mercado debido a su toxicidad.²⁰ Sin embargo, se había alcanzado un nuevo paradigma con remedios completamente sintéticos.

¹⁶ López-Muñoz, F.; Ucha-Udabe, R.; Alamo, C. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2005**, *1*, 329-343.

¹⁷ a) Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 1239-1249. b) Kelsey, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 470. c) Bevan, P.; Ryder, H.; Shaw, I. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 115-121.

¹⁸ a) Hoskins, C.; Mathur, S. *Biomed. Rep.* **2017**, *6*, 612-614. b) Silva, G. N. S.; Rezende, L. C. D.; Emery, F. S.; Gosman, G.; Gnoatto, S. C. B. *Mini Rev. Med. Chem.* **2015**, *10*, 809-836. c) Zanforlin, E.; Zagotto, G.; Ribaud, G. **2017**, *8*, 2356-2368.

¹⁹ Sneader, W. *Lancet.* **1998**, *352*, 1697-1699.

²⁰ Schlitzer, M. *Chem. Med. Chem.* **2007**, *2*, 944-986.

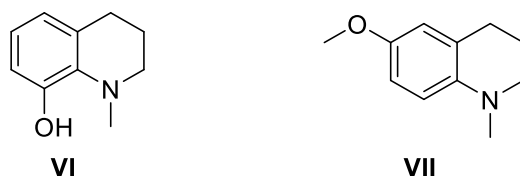


Figura 4. Análogos sintéticos de alcaloides.

El siguiente éxito sintético fue la obtención de la fenazona (figura 5, **VIII**). En 1884, Ludwig Knorr estudiaba una nueva tetrahydroquinolina, y encontró que durante la síntesis ocurría un reordenamiento que daba lugar a un producto con propiedades antiinflamatorias y antipiréticas. La fenazona dio lugar a diferentes derivados como la amidopiridina (figura 5, **IX**) o la azapropazona (figura 5, **X**).^{21,22}

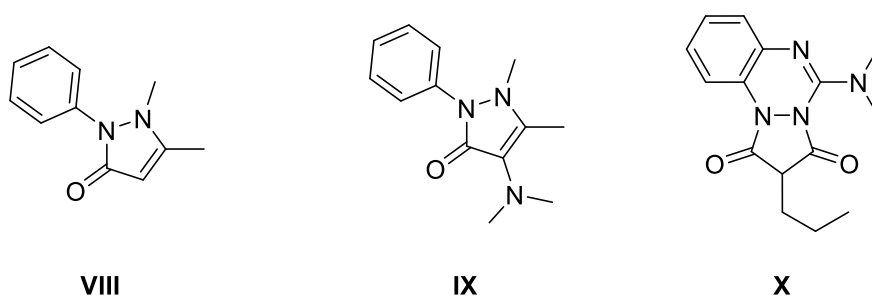


Figura 5. Fenazona y análogos sintéticos.

La producción industrial de gas metano de hulla comenzó al inicio del siglo XIX. El alquitrán remanente era desechado, hasta que el químico Friedlieb Runge en 1833 destiló un aceite que resultó ser fenol (figura 6, **XI**),¹⁹ utilizado posteriormente, como antiséptico durante las operaciones. Para evitar sus efectos irritantes en la piel y heridas, se desarrollaron análogos sintéticos, entre los que destacó el ácido salicílico (figura 6, **XII**), el cual parecía tener un efecto más prometedor sobre la artritis reumatoide que como antiséptico. El ácido salicílico fue sustituido por la aspirina (figura 6, **XIII**), patentada por Bayer, en la que el -OH fenólico causante del efecto irritante era acetilado consiguiendo enmascararse dicho efecto secundario.²³ Aunque el ácido salicílico también fue aislado del sauce blanco (*Salix alba*) en 1830, se considera que fue obtenido sintéticamente.

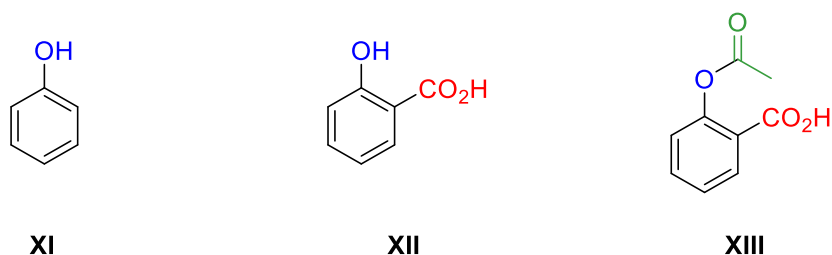


Figura 6. Fármacos de procedencia sintética.

²¹ Brune, K.; Hinz, B. *Arthritis Rheum.* **2004**, 50, 2391-2399.

²² Brune, K. *Acute Pain.* **1997**, 1, 33-40.

²³ a) Goldberg, D. R. *Chem. Herit.* **2018**, 27, 26-30. b) Sneader, W. *BMJ.* **2000**, 321, 1591-1594.

El aislamiento de principios activos, producidos por plantas y la obtención de productos químicos puros, proporcionaron a los médicos la oportunidad para examinar sistemáticamente sus efectos fisiológicos, utilizando cantidades exactamente medidas, proceso que contribuyó al inicio de la Farmacología.²⁴ De este modo se cerró el siglo XIX, el primer período en el descubrimiento de fármacos; pero era, simplemente, el despertar de una nueva rama científica.

1.1.6 SIGLOS XX y XXI

Para entender los avances en estos dos siglos, hay que conocer la figura del médico y premio Nobel de medicina Paul Ehrlich (figura 7a), considerado el fundador de la quimioterapia y un pionero en química farmacéutica.²⁵

Aunque había realizado trabajos previos, es a partir de 1906 cuando Ehrlich y sus colaboradores fijaron su atención en las espiroquetas, en especial el *Treponema pallidum* que había sido identificado como el agente productor de la sífilis un año antes. La sífilis data de finales del siglo XV y se había convertido en una auténtica pandemia en toda Europa.²⁶ La idea concebida por Ehrlich consistía en la incorporación de un potente veneno, como era el arsénico, en un colorante selectivo de protozoos a manera de transportador para atacar al agente causante de la enfermedad y destruirlo. Este era el concepto de la bala mágica.²⁷ Es la primera vez que se tenían en cuenta la selectividad de una sustancia activa y la existencia de ciertas dianas sobre las que actúan. Tras numerosos derivados, en 1909 se descubrió el Salvarsán (figura 7, XIV), en 5 años la incidencia de sífilis disminuyó un 80%.²⁸

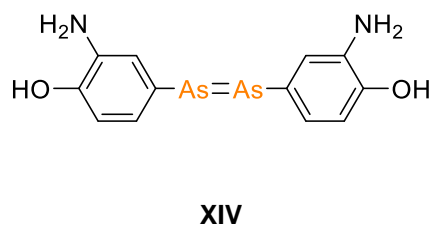
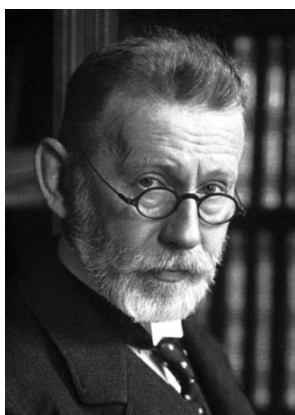


Figura 7. (a) Retrato de Paul Ehrlich. (b) Estructura química de Salvarsán.

Paul Ehrlich introdujo también el concepto de *farmacóforo*, para describir aquella parte activa de la molécula que interacciona más específicamente con el sistema biológico receptor y produce una respuesta.

²⁴ Rubin, R. P. *Pharmacol. Rev.* **2007**, 59, 289-359.

²⁵ Kaufmann, S. H. E. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, 8, 473-480.

²⁶ a) Tampa, M.; Sarbu, I.; Matei, C.; Benea, V.; Georgescu, S. R. *J. Med. Life.* **2014**, 7, 4-10. b) Karem, K. L.; Pillay, A. J. *Anc. Dis. Prev. Rem.* **2014**, 118, 1-3.

²⁷ a) Strebhardt, K; Ullrich, A. *Nat. Rev. Cancer.* **2008**, 8, 473-480. b) Gelpi, A.; Tucker, J. D. *Sex Transm. Infect.* **2015**, 91, 69-70. c) Williams, K. J. *J. R. Soc. Med.* **2009**, 102, 343-348.

²⁸ Lykknes, A.; Kvittingen, L. *J. Chem. Educ.* **2003**, 80, 497-500.

La idea que subyace en el concepto es que una pequeña modificación en dicha posición repercute drásticamente en la actividad, mientras que la variación en otras posiciones genera una respuesta menor, mínima o insignificante.²⁷ Acuñó también el término *agente quimioterapéutico* para definir compuestos que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos infecciosos, sin afectar de manera sensible a las células del organismo superior infectado. Posteriormente, este término se ha extendido también a los agentes que destruyen células tumorales.²⁷

Con estos conceptos, al inicio del siglo se establecen las bases metodológicas y no tardarían en comenzar a descubrirse los medicamentos más importantes que conocemos hoy en día.

1.1.6.1 Hormonas

Las hormonas son sustancias químicas endógenas producidas en un órgano o en las células y son las encargadas de realizar diversas funciones en el organismo. La elevada o escasa producción hormonal puede conllevar enfermedades. Por esto, las hormonas o sus análogos sintéticos pueden actuar supliendo la falta o exceso de producción.

La primera hormona aislada fue la adrenalina (figura 8, **XV**) en 1901 por Jokichi Takamine. Inicialmente, comercializada como vasoconstrictor,²⁹ también ha mostrado eficacia como broncodilatador.³⁰ La siguiente hormona obtenida fue la tiroxina (figura 8, **XVI**) en 1915, por Edward Kendall.³¹ Poco después, fue comercializada en el tratamiento para la deficiencia de tiroides y aún continúa siendo prescrita. El hallazgo y aislamiento de la hormona peptídica insulina (figura 8, **XVII**) en 1922, por Friedrich Banting y Charles Best, logró salvar la vida de millones de personas diabéticas.³² Este hito les valió a ambos el premio Nobel de fisiología y medicina en 1923.³³

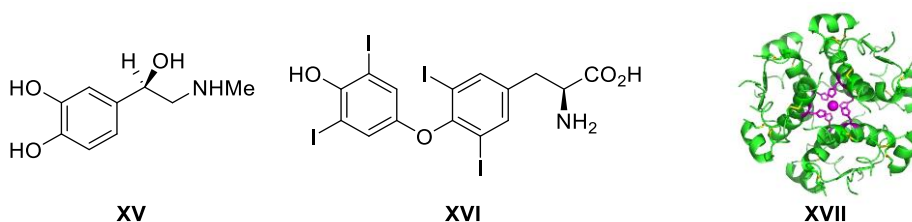


Figura 8. Primeras hormonas no-esteroideas.

En 1923, Edgar Allen y Edward Doisy consiguieron estrona (figura 9, **XVIII**) a partir de cientos de litros de orina de yeguas embarazadas y fue utilizada para aliviar los dolores asociados a la menopausia.³⁴ Unos años más tarde, Adolf Butenandt aisló la progesterona (figura 9, **XIX**) y el estradiol (figura 9, **XX**), que manifestaron mejor perfil

²⁹ Bolli, P.; Erne, P.; Ji, B.H.; Block, L. H.; Kiowski, W.; Bühler, F. R. *J. Hypertens. Suppl.* **1984**, 2, 115-118.

³⁰ Bullowa, J. G.; Kaplan, D. M. *Med. News.* **1903**, 83, 787-790.

³¹ Kendall, E. C. *J. Am. Med. Assoc.* **1915**, 64, 2042-2043.

³² Quianzon, C. C.; Cheikh, I. *J. Community. Hosp. Intern. Med. Perspect.* **2012**, 2, 1-3.

³³ Rosenfeld, L. *Clin. Chem.* **2002**, 48, 2270-2288.

³⁴ Nielsch, U.; Fuhrmann, U.; Jaroch, S. (2016) *New Approaches to Drug Discovery*. Springer.

farmacológico que la estrona.³⁵ En los años 30, se utilizaron técnicas de extracción similares para obtener hormonas presentes en el córtex de las glándulas adrenérgicas; las cantidades eran ínfimas hasta 1948, cuando Edward Kendal sintetizó varios gramos de cortisona (figura 9, **XXI**), la cual mostró potentes propiedades contra la artrosis. Sin embargo, se observaron graves problemas asociados a su uso prolongado.³⁶

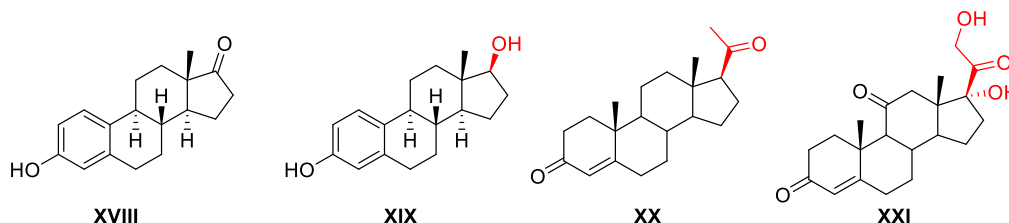


Figura 9. Ejemplos de hormonas esteroideas con relevancia clínica.

1.1.6.2 Agentes antibióticos

El primer antimicrobiano para tratar infecciones descubierto de manera racional se atribuye a Paul Ehrlich, y en base a su trabajo comienzan a estudiarse nuevos agentes.²⁸ La compañía Bayer, que poseía una gran cantidad de moléculas orgánicas para ensayar gracias a su departamento de tintes, descubrió una con potente actividad antibacteriana en 1926, la sulfonamida prontosil rubrum (figura 10, **XXII**). Junto a otras sulfonamidas, desarrolladas por otras compañías, dominó el mercado de los antibióticos hasta el aislamiento de la penicilina.³⁷

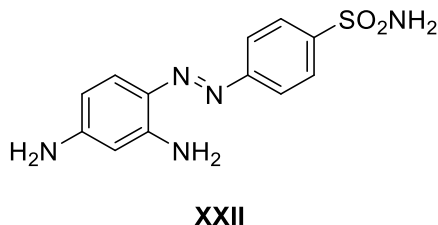


Figura 10. Estructura química de prontosil rubrum.

La historia sobre la inhibición de un cultivo bacteriano a causa del hongo *Penicillium* en 1928 por Alexander Fleming es más que conocida; sin embargo, no logró aislar la molécula que causaba dicho efecto.³⁸ En 1939, Ernst Chain y Howard Florey obtuvieron pequeñas cantidades de penicilina (figura 11, **XXIII**) que mostraron ser clínicamente efectivas. A pesar de sus avances, el estallido de la 2ª guerra mundial hizo que ambos

³⁵ Bullough, V. (1995). *Science in the Bedroom: A history of sex research*. Basic Books.

³⁶ Lemke, T. L.; Williams, D. A. (1998). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.

³⁷ Bentley, R. J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 36, 775-786.

³⁸ Tan, S. Y.; Tatsumura, Y. *Singapore Med. J.* **2015**, 56, 366-367.

investigadores tuviesen que migrar a Estados Unidos para la producción a gran escala de penicilina.³⁹

El desarrollo en 1957 de la amoxicilina (figura 11, **XXIV**), activa oralmente gracias a un cambio en la cadena lateral, impulsó el esfuerzo de las compañías por encontrar nuevas alternativas.⁴⁰ Estas modificaciones semi-sintéticas ampliaron el espectro frente al cual las penicilinas eran activas, y dieron lugar a análogos que no se veían afectados por las enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas (β -lactamasas).⁴¹ Uno de estos ejemplos es la metilicina (figura 11, **XXV**) que era capaz de actuar frente al *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina. Durante los años 60 se aislaron las cefalosporinas (figura 11, **XXVI**), procedentes del hongo *Cephalosporium*.⁴²

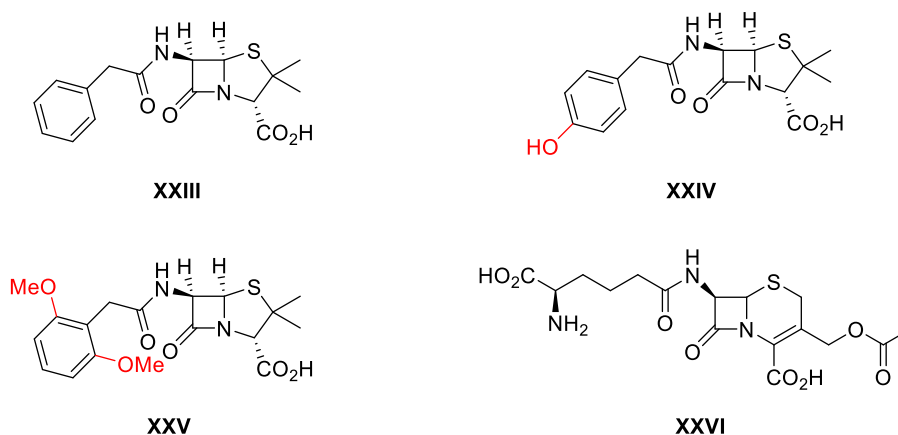


Figura 11. Ejemplos de antibióticos β -lactámicos con relevancia clínica.

La necesidad de nuevos antibióticos condujo a un análisis masivo de diferentes hongos y bacterias. Aunque se aislaron miles de antibióticos, sólo han permanecido unos 50 en el mercado. Sin embargo, su impacto en el tratamiento de infecciones ha sido enorme, el incremento de resistencia frente a los antibióticos disponibles en el mercado es causa de preocupación a nivel mundial.⁴³

1.1.6.3 Agentes antitumorales

El estudio de los primeros agentes quimioterapéuticos se inicia con la entrada de Estados Unidos en la 2ª guerra mundial. Louis Goodman y Alfred Gilman estaban investigando las propiedades toxicológicas del gas mostaza HN-3 (figura 12, **XXVII**). Hallaron que el agente atacaba más rápidamente a células de división rápida, lo que les hizo suponer que podría tener selectividad frente a las células tumorales. Tras un examen inicial

³⁹ a) Lobanovska, M.; Pilla, G. *Yale J. Biol. Med.* **2017**, 90, 135-145. b) Gaynes, R. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, 23, 849-853.

⁴⁰ a) Selwyn, S. *J. Antimicrob. Chemother.* **1982**, 9, 1-10. b) Miller, E. L. *J. Midwifery Womens Health.* **2002**, 6, 426-434.

⁴¹ Bush, K.; Bradford, A. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, 1, 1-9.

⁴² Bush, K.; Bradford, P. A. *Cold. Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, 54, 969-976.

⁴³ a) Docquier, J-D.; Mangani, S. *Drug Resist. Updat.* **2018**, 36, 13-29. b) Zaman, S. B.; Hussain, M. A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K. T.; Hossain, N. *Cureus.* **2017**, 9, 1-9. c) Frieri, M.; Kumar, K.; Boutin, A. *J. Infect. Public Health.* **2017**, 10, 369-378.

detectaron cierta remisión, pero era breve. En base a esta observación se sintetizaron análogos químicos disminuyendo la reactividad con la sustitución de la amina central, como es el caso del clorambucilo (figura 12, **XXVIII**).⁴⁴

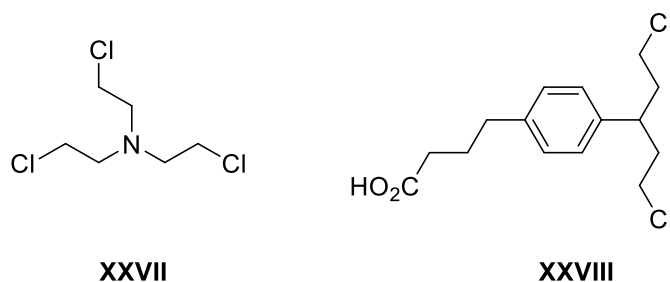
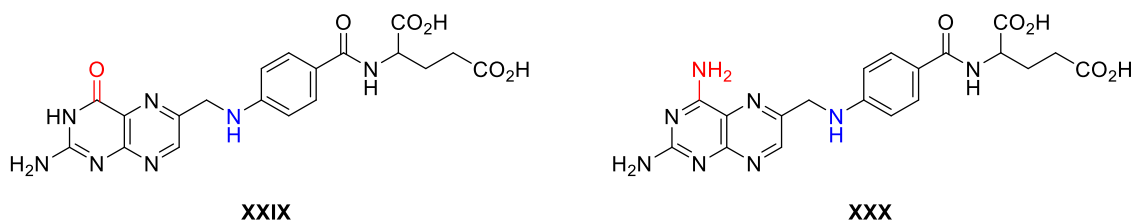


Figura 12. Primeros agentes antitumorales derivados de los gases mostaza.

Los siguientes agentes quimioterapéuticos fueron los antimetabolitos. El primero fue descubierto tras un ensayo en ratones con ácido fólico (figura 13, **XXIX**), a los cuáles se les inhibía el crecimiento de cáncer de pulmón.⁴⁵ Después de este primer ensayo, Sidney Farber decidió realizar un ensayo preliminar en pacientes, detectando un incremento de las células malignas en pacientes con leucemia. Tras estos resultados se puso en contacto con los laboratorios Lederle, que habían suministrado la vitamina y consultó si era posible desarrollar algún antimetabolito. La respuesta fue recibida en 1947, con un antimetabolito del ácido fólico en el que el ácido aspártico reemplazaba al ácido glutámico del ácido fólico. A pesar de disminuir el crecimiento de células tumorales, no se pudo salvar ninguna vida. No es hasta la obtención de los derivados aminopterina (figura 13, **XXX**) y metotrexato (figura 13, **XXXI**), cuando se logró salvar la vida del 30% de los pacientes.⁴⁶ Este resultado estimuló la investigación de los antimetabolitos, preparándose análogos de aquellos metabolitos claves en el ciclo celular. Pronto se descubrió la mercaptopurina (figura 13, **XXXII**), que en combinación con el metotrexato produjo una reducción de leucemia en niños de hasta el 90%. La remisión fue temporal, siendo necesario administrar ciclos repetidos. Hoy en día, con este tipo de terapias se consigue salvar la vida de hasta el 70% de los pacientes con leucemia linfática.⁴⁷



⁴⁴ Singh, R. K.; Kumar, S.; Prasad, D. N.; Bhardwaj, T.R. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 151, 401-433.

⁴⁵ Leuchtenberg, R.; Leuchtenberg, C.; Laszlo, D.; Lewishon, R. *Science*. **1945**, 101, 45-46.

⁴⁶ Bertino, J. R. (2000). *Methotrexate: historical aspects*. Springer.

⁴⁷ Hallek, M. *Am. J. Hematol.* **2017**, 92, 946-965.

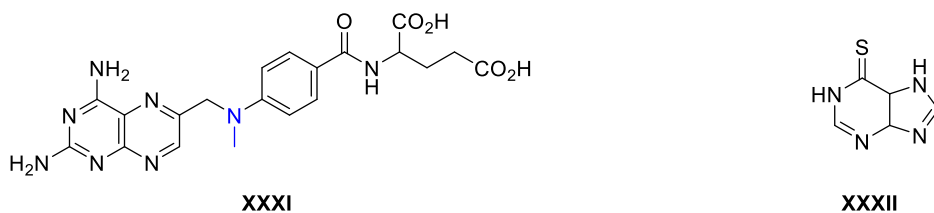


Figura 13. *Ácido fólico y primeros antimetabolitos antitumorales.*

Las sustancias quimioterapéuticas han estado asociadas siempre con citotoxicidad. En las dos últimas décadas se han realizado progresos significativos en el diseño de nuevos medicamentos selectivos, cabe destacar los inhibidores de proteínas quinasa, como gefitinib (figura 14, XXXIII) e imatinib (figura 14, XXXIV).⁴⁸ A partir de los mismos se han comenzado a desarrollar un alto número de inhibidores de quinasa que están en fase clínica.⁴⁹

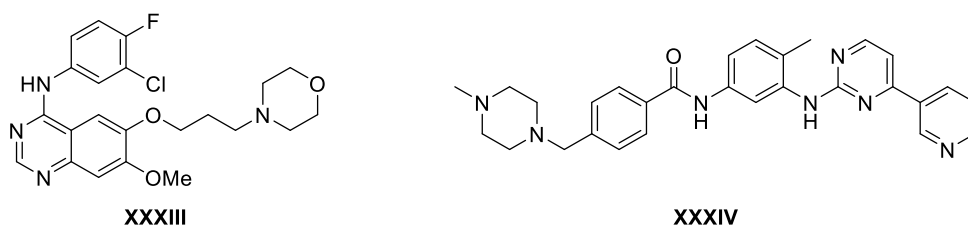


Figura 14. *Primeros inhibidores de proteínas quinasa comercializados.*

1.1.6.4 Agentes cardiovasculares: estatinas

La introducción de las estatinas durante los años 70 ha sido otro de los hallazgos con mayor impacto en la medicina moderna.⁵⁰ Estas actúan inhibiendo la biosíntesis de colesterol,⁵¹ disminuyendo los niveles de colesterol en sangre y por consiguiente el riesgo de problemas cardíacos, siendo estos la principal causa de defunción en países del primer mundo según la organización mundial de la salud (OMS).⁵²

El trabajo sobre estatinas se inició en 1971 cuando el químico japonés Akira Endo emprende un proyecto para el descubrimiento de un compuesto capaz de inhibir la producción de colesterol. Su trabajo estuvo focalizado en el análisis de metabolitos producidos por microorganismos, logrando aislar la mevastatina (figura 15, XXXV) procedente del hongo *Penicillium citrinum*, tras un estudio previo de 6000 especies. La primera estatina introducida en el mercado fue la lovastatina (figura 15, XXXVI) en 1987

⁴⁸ Shokat, M. K.; Dar, A. C. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 769-795.

⁴⁹ Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2015**, *38*, 422-439.

⁵⁰ Hajar, R. *Heart Views.* **2011**, *12*, 121-127.

⁵¹ Stancu, C.; Sima, A. J. *Cell. Mol. Med.* **2001**, *5*, 378-387.

⁵² World Health Organization. *Avoiding heart attacks and strokes: Don't be a victim, protect yourself.* **2005.**

por la compañía Merck. No tardaron en ver la luz nuevas estatinas, incluyendo la atorvastatina (figura 15, **XXXVII**), una de las más vendidas en el mundo.⁵³

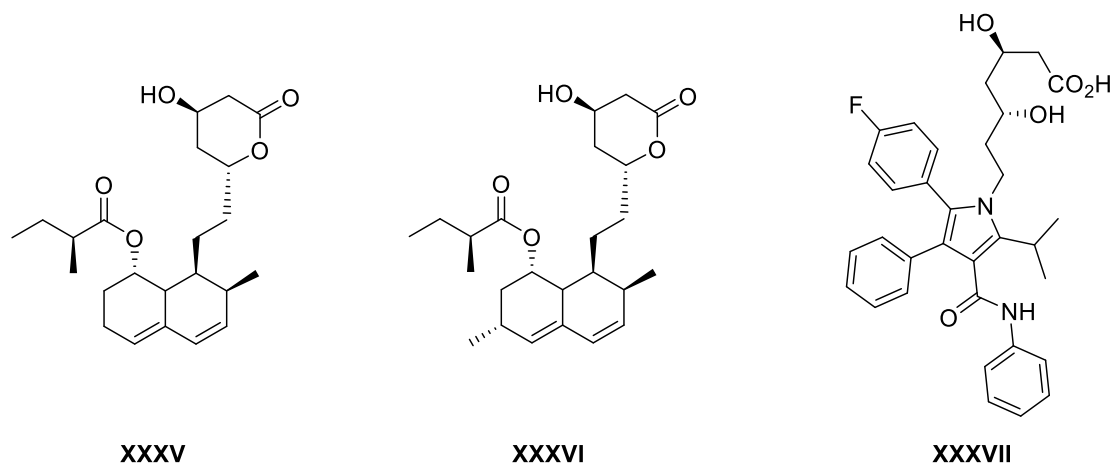


Figura 15. Mevastatina y estatinas comerciales.

1.1.6.5 Agentes antivirales

Los agentes quimioterapéuticos antivirales representan uno de los éxitos más recientes y fructíferos del ser humano. Desde los años 80 hasta hoy, se ha logrado entender completamente la estructura y el ciclo viral.⁵⁴ La difracción de rayos X y el modelado molecular por ordenador, han sido claves para encontrar candidatos adecuados en las terapias antivirales.

Cuando se descubrió que el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) era el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), todas las compañías emprendieron una carrera para realizar experimentos con nuevos y antiguos antimetabolitos frente al virus. El primer antiviral que dio resultados fue zidovudina (AZT) (figura 16, **XXXVIII**), el cual se descartó, en terapias antitumorales, por su toxicidad.⁵⁵ Sin embargo, causa de la necesidad de una cura efectiva frente al virus, AZT es el fármaco que más rápido ha superado los ensayos clínicos.

Algunos de los antimetabolitos efectivos frente a virus, han sido antitumorales desechados previamente por su toxicidad. Es el caso del Aciclovir (figura 16, **XXXIX**), utilizado para el tratamiento del herpes simplex, que se desarrolló como un análogo de la citarabina. Al sustituir el resto azúcar de la citarabina (figura 16, **XL**) por un resto acíclico se perdía toda la citotoxicidad asociada.⁵⁶

⁵³ a) Endo, A. *Proc. Jpn. Acad.* **2010**, *86*, 484-493. b) Lim, S. Y. *Chonnam Med. J.* **2013**, *49*, 1-6. c) Schultz, B. G.; Patten, D.; Berlau, D. J. *Transl Neurodegener.* **2018**, *7*, 1-11.

⁵⁴ Pauwels, R. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 77-89.

⁵⁵ a) Sperling, R. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **1998**, *6*, 197-203. b) Broder, S. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 1.

⁵⁶ Bryan-Marrugo, O. L.; Ramos-Jiménez, J.; Barrera-Saldaña, H.; Rojas-Martínez, A.; Vidaltamayo, R.; Rivas-Estilla, A. M. *Medicina Universitaria.* **2015**, *17*, 165-174.

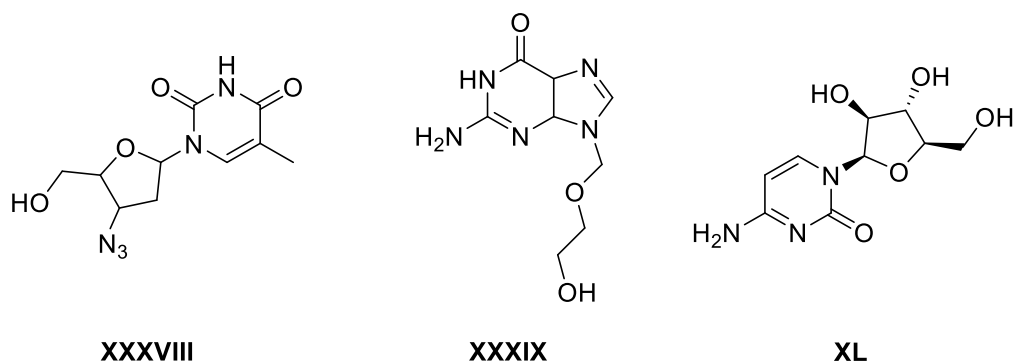


Figura 16. Primeros antimetabolitos utilizados en el tratamiento de infecciones virales.

En las dos últimas décadas se ha llevado a cabo un gran progreso con los inhibidores de proteasas virales.⁵⁷ Inhibiendo este proceso, no se pueden formar virus en la célula infectada y por tanto no se puede expandir la infección. En este apartado han tenido especial relevancia los inhibidores de proteasa VIH-1. El primer inhibidor de proteasa comercializado fue saquinavir (figura 17, **XLI**), en 1995. No obstante, presentó baja biodisponibilidad debido a su carácter peptídico.⁵⁸ La línea de investigación que se desarrolló posteriormente fue disminuyendo el carácter peptídico para aumentar la absorción. El VIH no es el único virus que contiene la enzima proteasa. En 2011, boceprevir y telaprevir (figura 17, **XLII** y **XLIII**) fueron introducidos en el mercado para el tratamiento de la hepatitis C y mejoraron significativamente a los tratamientos anteriores.⁵⁹

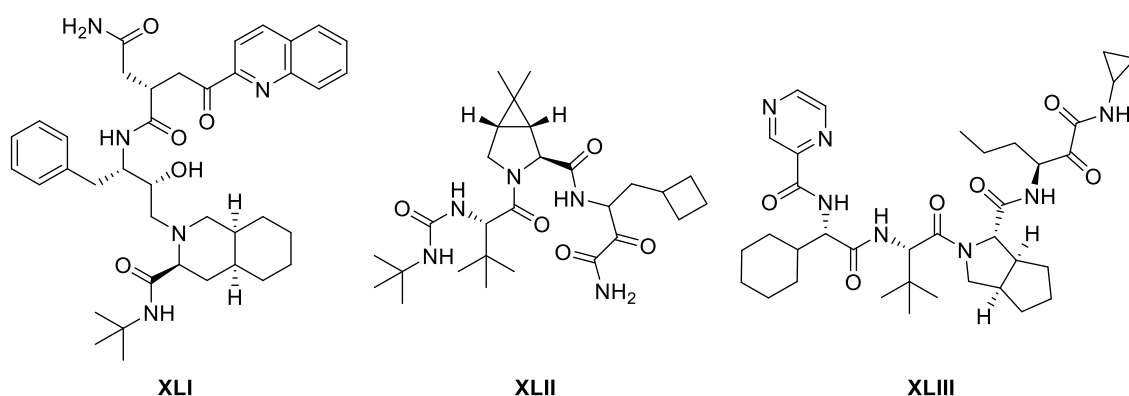


Figura 17. Principales inhibidores de proteasa utilizados en terapias antivirales.

⁵⁷ a) Zhengtong, L.; Chu, Y.; Wang, Y. *HIV AIDS*. **2005**, 7, 95-104. b) Agbowuro, A. A.; Huston, W. M.; Gamble, A. B.; Tyndall, J. D. A. *Med. Res. Rev.* **2018**, 38, 1295-1331.

⁵⁸ Noble, S.; Faulds, D. *Drugs*. **1996**, 52, 93-112.

⁵⁹ Wilby, K. J.; Partovi, N.; Ford, J. E.; Greanya, E. D.; Yoshida, E. M. *Can. J. Gastroenterol.* **2012**, 4, 205-210.

Si bien existen miles de remedios para tratar las diferentes enfermedades, se han querido dar a conocer algunos de los ejemplos más sobresalientes descubiertos hasta el momento y que han generado un cambio significativo en la química farmacéutica.

1.2 ETAPAS EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS

No hay lugar a dudas de que un nuevo agente terapéutico tiene un impacto positivo en la sociedad. Sin embargo, desde el descubrimiento hasta su comercialización, las compañías farmacéuticas tienen que atravesar un procedimiento largo y arduo. Esto es necesario para lograr un producto seguro y eficaz, cuyos beneficios sean superiores a su riesgo.⁶⁰

Dada la complejidad asociada al diseño y obtención de nuevos fármacos, es evidente que no cualquier molécula podrá ser comercializada. El proceso de descubrimiento es una tarea multidisciplinar que requiere la coordinación de todas las piezas integrantes, entre las cuales se encuentran: la química médica, los estudios *in vitro*, la farmacología animal, la química industrial, los perfiles farmacológicos, la propiedad intelectual e infinidad de campos, con sus correspondientes especialistas.⁶¹ Si se unifican todos estos componentes, la recompensa puede ser sustancial, como indican ejemplos como la Atorvastatina,⁶² utilizada para la reducción del colesterol, que tiene unas ventas anuales de 13 billones de dólares o Montelukast,⁶³ utilizado para el asma, que presenta unas ventas de 5.5 billones de dólares. Pero hay que tener en cuenta que el tiempo y la inversión para llegar a este punto son notables y no todas las compañías pueden afrontarlo.⁶⁴ En la figura 18 se detalla el tiempo y los costes asociados al descubrimiento de un nuevo fármaco.

⁶⁰ a) Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 162, 1239-1249. b) Lipisky, M. S.; Sharp, L. K. *J. Am. Board Farm. Pract.* **2001**, 14, 362-367.

⁶¹ Lombardino, J. G.; Lowe, J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 853-862.

⁶² Ledford, H. *Nature*. **2011**, 480, 16-17.

⁶³ Barbosa, J. S.; Almeida, P. F. A.; Braga, S. S. *Drug Delivery*. **2016**, 23, 3257-3265.

⁶⁴ a) Vernon, J. A.; Golec, J. H.; Dimasi, J. A. *Health Econ.* **2010**, 19, 1002-1005. b) Paul, S. M.; Mytelka, D. S.; Dunwiddie, C. T.; Persinger, C. C.; Munos, B. H.; Lindborg, S. R.; Schacht, A. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 203-214.

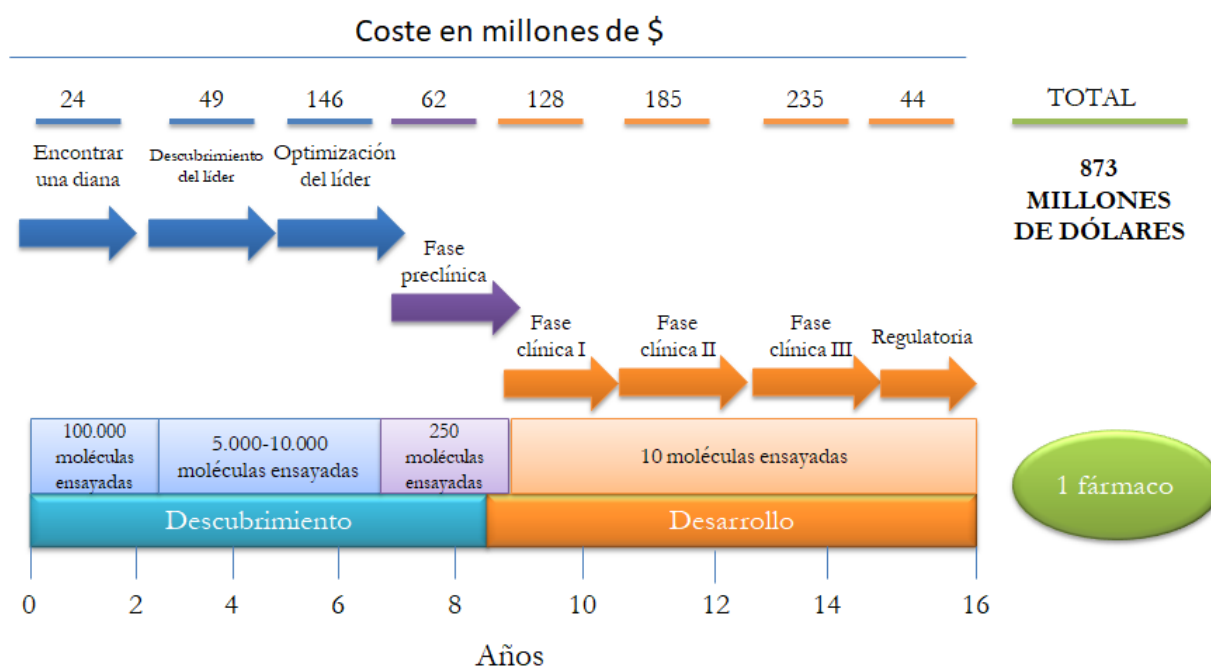


Figura 18. Tiempo y coste estimado para sacar un nuevo medicamento al mercado.

El proceso para encontrar un nuevo medicamento puede dividirse en dos niveles básicos:

-El primero está referido al hallazgo de un cabeza de serie, e incluye todos los experimentos llevados a cabo, desde el reconocimiento de una diana biológica asociada a una enfermedad hasta la identificación de un compuesto con potencial para ser clínicamente relevante. En este punto se prueban miles de sustancias y se observa cómo modulan la actividad biológica. La etapa de descubrimiento se ha logrado cuando se demuestra satisfactoriamente que la molécula ensayada es efectiva *in vivo* sobre un modelo animal adecuado. Esto es determinado en la fase preclínica.⁶⁵

-Una vez superada satisfactoriamente la fase preclínica, comienza el ciclo de desarrollo. El primer paso es conseguir la aprobación del documento “Investigational New Drug” (IND), un modelo donde se justificarán todos los resultados de las pruebas realizadas previamente y la seguridad, para poder avanzar hacia los ensayos clínicos.⁶⁶ Mientras que los ensayos clínicos pueden variar sustancialmente en función del candidato y la enfermedad, todos los estudios están divididos en fase I, II, III y IV.⁶⁷

A continuación, se detallarán con más profundidad las etapas más relevantes, con especial énfasis en el apartado de descubrimiento, sobre el cual se asienta el trabajo de esta tesis doctoral.

⁶⁵ a) Prakash, N.; Devangi, P. J. *Antivir. Antiretrovir.* **2010**, 2, 63-68. b) Baig, M. H.; Ahmad, K.; Adil, M.; Khan, Z. A.; Khan, M. I.; Lohani, M.; Khan, M. S.; Kamal, M. A. *Enz. Eng.* **2014**, 4, 1-3. c) Warren, J. B.; *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, 71, 497-503.

⁶⁶ McInnes, J. S. (2011). *New Drugs Applications*. Pharmaceutical Sciences Encyclopedia.

⁶⁷ Umscheid, C. A.; Margolis, D. J.; Grossman, C. E. *Postgrad. Med.* **2011**, 123, 194-204.

1.2.1 SELECCIÓN DE UNA DIANA

El primer paso para identificar un nuevo cabeza de serie comienza con una enfermedad o dolencia, la cual puede ser modificada a través de una correcta intervención quimioterapéutica.⁶⁸ Las enfermedades de mayores necesidades médicas deberían ser las de prioridad más alta. No obstante, en la práctica existen diversos motivos que contribuyen a iniciar o no un programa de descubrimiento de fármacos.

Puede ocurrir que el mecanismo no esté claro para una enfermedad en particular, incluso aunque esta sea de urgencia. Es el caso del Alzheimer, a pesar de la ingente cantidad de capital invertido en su investigación, tanto a nivel gubernamental como corporativo, no se ha logrado un tratamiento apropiado. Esto se debe a la falta de una diana eficaz para la enfermedad.⁶⁹

En otros casos, es conocida la interacción con una diana específica a través de experimentos *in silico* e *in vitro*, pero es necesaria, posteriormente, la confirmación sobre un modelo animal. Esto ha ocurrido con la “proteína colesterol éster transferasa” (CETP), que juega un rol importante en la interconversión de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y baja densidad (LDL).⁷⁰ Se ha considerado que la inhibición de esta proteína puede tener un impacto positivo en los pacientes que sufren hipercolesterolemia. Sin embargo, a pesar de haberse hallado potentes inhibidores de CETP como Torcetrapib y Dalcetrapib (figura 19, XLIV y XLV), ninguno ha llegado a ser aprobado para su comercialización. Estos resultados pueden ser debidos a que CEPT no es una diana apta para enfermedades cardiovasculares.⁷¹

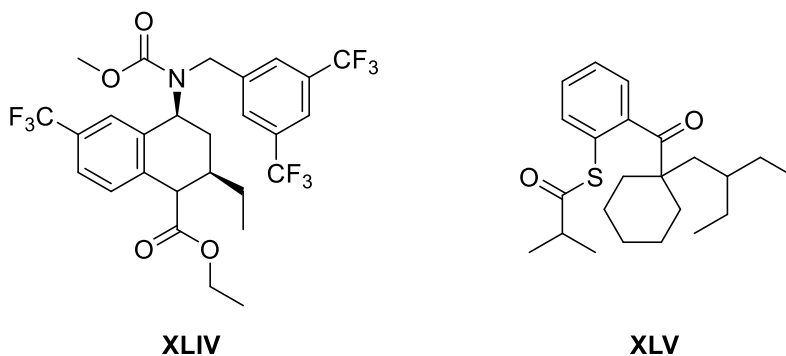


Figura 19. Estructura química de los inhibidores de CETP.

⁶⁸ a) Knowles, J.; Gromo, G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 63-69. b) Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 162, 1239-1249. c) Ramsay, R. R.; Popovic-Nikolic, M. R.; Nikolic, K.; Uliassi, E.; Bolognesi, M. L. *Clin. Trans. Med.* **2018**, 7, 1-14.

⁶⁹ a) Minati, L.; Edginton, T.; Bruzzone, M. G.; Giaccone, G. *Am. J. Alzheimer's Dis. Other Dementias.* **2009**, 24, 95-121. b) Cummin, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Zhong, K. *Alzheimers Dement.* **2018**, 4, 195-214.

⁷⁰ a) Barter, P. J.; Brewer, H. B.; Chapman, M. J.; Hennekens, C. H.; Rader, D. J.; Tall, A. R. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, 23, 160-167. b) Hu, J.; Walker, S. *Hosp. Pharm.* **2017**, 52, 596-598. c) Shresta, S.; Wu, B. J.; Guiney, L.; Barter, P. J.; Rye, K. A. *J. Lipid Res.* **2018**, 59, 772-783.

⁷¹ Droggell, S. A. *Expert Opin. Pharmacother.* **2017**, 14, 1439-1442.

Hay ocasiones en las que las compañías trabajan con dianas terapéuticas previamente conocidas. Cuando se decide iniciar un programa de esta manera, suele existir un amplio volumen de información en la literatura para comenzar. Pero hay que tener en cuenta que no todo son ventajas, ya que se requiere que cualquier molécula derivada del estudio deberá mostrar superioridad clínica a las presentes en el mercado y se pueden llegar a incurrir en problemas de patentabilidad.⁷²

Finalmente, son los factores económicos los que juegan un papel más crucial cuando se determinan la enfermedad y la diana investigada.⁷³ Las compañías farmacéuticas son empresas y su decisión final dependerá de los beneficios económicos que se pueden derivar.

La selección de una enfermedad y su diana afectarán a todos los factores del programa en estudio.

1.2.2 DESCUBRIMIENTO DE UN CABEZA DE SERIE

Una vez seleccionada una diana de interés, comienza la tarea de encontrar un único compuesto adecuado para ser llevado a nivel clínico. Existiendo millones de moléculas disponibles, la misión se presenta inicialmente como muy ardua. Afortunadamente, hay algunas pautas para simplificar este proceso. De entre todas, las más destacadas son las 5 reglas de Lipinski:⁷⁴

- 1) Un peso molecular inferior a 500.
- 2) logP sea inferior a 5.
- 3) Menos de 5 donadores de enlace de hidrógeno.
- 4) Menos de 10 aceptores de enlace de hidrógeno.
- 5) Menos de 10 enlaces rotables.

Aunque hay excepciones para estas reglas,⁷⁵ sobre todo en el campo de los productos naturales,⁷⁶ su aplicación para definir un espacio químico inicial es útil. A pesar de estas restricciones, queda un vasto espacio químico por explorar.

Por fortuna, se han desarrollado diversas herramientas que actúan como filtro. Existen dos métodos generales utilizados en los programas de descubrimiento de fármacos,

⁷² a) Croston, G. E. *Expert Opin Drug Discov.* **2017**, *12*, 427-429. b) Mohs, R. C.; Greig, N. H. *Alzheimers Dement.* **2017**, *3*, 651-657.

⁷³ a) Schweitzer, S. O.; Lu, J. Z. (2018) *Pharmaceutical economics and policy*. Oxford scholarship. b) Vernon, J. A.; Golec, J. H. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* **2011**, *11*, 1-3.

⁷⁴ a) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26. b) Lipinski, C. A. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 337-341. c) Pollastri, M. P. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2010**, *49*, 1-8.

⁷⁵ a) DeGoey, D. A.; Chen, H-J.; Cox, P. B.; Wendt, M. D. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2636-2651. b) Benet, L. Z.; Hosey, C. M.; Ursu, O.; Oprea, T. I. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *101*, 89-98. Doak, B. C.; Over, B.; Giordanetto, F.; Kihlberg, J. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1115-1142.

⁷⁶ a) Zhang, M. Q.; Wilkinson, B. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 478-488. b) Ganesan, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 306-317.

el cribado farmacológico de alto rendimiento (HTS) físico y virtual.⁷⁷ Ambos sistemas no son exclusivos y en muchos casos se utilizan en tándem.

En el HTS físico se utilizan moléculas disponibles de fuentes comerciales, además de las propias colecciones que poseen las compañías. En este tipo de cribado se requiere de sistemas sofisticados y completamente automatizados para poder asimilar el ingente volumen de datos generados⁷⁸. Alternativamente, en el cribado virtual se combinan sistemas avanzados de modelado molecular con bibliotecas químicas virtuales e información estructural de las dianas.⁷⁹ Al igual que el cribado físico, ofrece ciertas limitaciones a valorar. La primera y más fundamental es que son predicciones basadas en un modelo.⁸⁰ Por esto, los candidatos tienen que ser validados en sistemas biológicos para confirmar las predicciones.

Independientemente del método utilizado, un cribado adecuado generará una gran cantidad de estructuras aptas que necesitarán ser analizadas por separado. Idealmente en este paso se debería quedar un grupo reducido de moléculas relacionadas entre sí, lo que puede ayudar a identificar relaciones estructura-actividad.

1.2.3 LOS PRODUCTOS NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS.

Puesto que el trabajo de esta memoria ha sido llevado a cabo mediante la investigación de productos naturales (PNs) o derivados de los mismos, se considera conveniente recalcar el papel predominante que continúan teniendo los mismos en el descubrimiento de fármacos, especialmente en los estadios iniciales.

La naturaleza ha servido como fuente de inspiración para obtener medicinas a lo largo de la historia.⁸¹ Los metabolitos secundarios presentan una gran diversidad estructural ya sean producidos por plantas, microorganismos o minerales.⁸² Debido a su procedencia, inherentemente están asociadas a un espacio químico de relevancia biológica, habiéndose optimizado su interacción con proteínas a lo largo de un proceso evolutivo de miles de años en algunos casos.⁸³

Desde 1981 hasta 2014, más de la mitad de los medicamentos aprobados por la administración de alimentos y medicamentos (FDA) provienen de fuentes naturales

⁷⁷ a) Roy, A. *High Throughput*. **2018**, 7, 1-14. b) Hajare, A. A.; Salunkhe, S. S.; Mali, S. S.; Gorde, S. S.; Nadaf, S. J.; Pishawikar, S. A. *Am. J. PharmTech Res.* **2014**, 4, 112-129. c) Subramaniam, S.; Mehrotra, M.; Gupta, D. *Bioinformation*. **2008**, 3, 14-17. d) Soufan, O.; Ba-alawi, W.; Magana-Mora, A.; Essack, M.; Bajic, V. B. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 1-10.

⁷⁸ Szymansky, P.; Markowicz, M.; Mikiciuk-Olasik, E. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 427-452.

⁷⁹ Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O. *J. Cell Mol. Med.* **2009**, 13, 238-248.

⁸⁰ a) Lionta, E.; Spyrou, G.; Vassilatis, D.; Cournia, Z. *Curr. Top Med. Chem.* **2014**, 14, 1923-1938. b) Katsila, T.; Spyroulias, G. A.; Patrinos, G. P.; Matsoukas, M-T. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2016**, 14, 177-184.

⁸¹ a) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629-661. b) Havey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14, 111-129 c) Shen, B. *Cell*. **2015**, 163, 1297-1300.

⁸² Patridge, E.; Gareiss, P.; Kinch, M. S.; Hoyer, D. *Drug Discov. Today*. **2016**, 21, 204-207.

⁸³ a) Traxler, M. F.; Kolter, R. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 956-970. b) Florez, L. V.; Biedermann, P. H.; Engl, T.; Kaltenpoth, M. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 971-993.

incluyendo moléculas inalteradas, derivados químicamente modificados y miméticos, con especial importancia en los tratamientos antimicrobianos y antitumorales.⁸¹

A pesar de estos datos, hubo una época entre la década de 1990 y la primera década del siglo XXI que las compañías disminuyeron su investigación en productos naturales. Este hecho fue debido a nuevas técnicas en metagenómica, química combinatoria y el cribado masivo, las cuales se pensaban que llevarían a cabezas de serie de manera más rápida y eficiente. No obstante, los resultados no fueron los esperados ya que si bien la producción de nuevas entidades era más rápida, el espacio químico que ocupaban no era el mismo que los PNs. Debido a ello, las compañías han retomado al análisis de los productos naturales durante la última década.⁸⁴

Si bien los productos naturales no modificados continúan utilizándose, los análogos estructurales han adquirido mayor peso. Las compañías han aprendido a sinergizar los conocimientos de metagenómica, química combinatoria y el cribado masivo con los PNs para producir fármacos a través del diseño racional, optimizándose la eficacia, la toxicidad y las propiedades farmacocinéticas.⁸⁵

Actualmente, las compañías están centrándose en la observación de microorganismos marinos que se encuentran en simbiosis con diferentes algas y esponjas,⁸⁶ así como, la expresión de genes heterólogos y genes silenciados mediante manipulación genética para desarrollar nuevos productos a través de ingeniería biosintética.⁸⁷

1.2.4 OPTIMIZACIÓN DE UN CABEZA DE SERIE

Una vez que se han seleccionado las moléculas adecuadas para el siguiente paso, comienza su optimización. Esta etapa ha evolucionado desde un modo lineal en el que se iban mejorando, una a una, todas las propiedades hasta un modelo multivariable, en el que se van optimizando todos los parámetros de manera simultánea (figura 20).⁸⁸

⁸⁴ a) Butler, M. S. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 2141-2153. b) Georgiev, M. I. *Phytochem Rev.* **2016**, 15, 511-513.

⁸⁵ a) Xiao, Z.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H. *Med. Res. Rev.* **2016**, 36, 32-91. b) Zhang, Y.; Zhang, Z.; Wang, B.; Liu, L.; Che, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 1885-1888. c) Kim, E.; Moore, B. S.; Yoon, Y. *J. Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 649-659.

⁸⁶ Piel, J.; Hui, D.; Wen, G.; Butzke, D.; Platzer, M.; Fusetani, N. *Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 16222-16227.

⁸⁷ Wenzel, S. C. Mueller, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 594-606.

⁸⁸ Keserü, G. M.; Makara, G. M. *Drug Discov. Today.* **2006**, 15, 741-748.

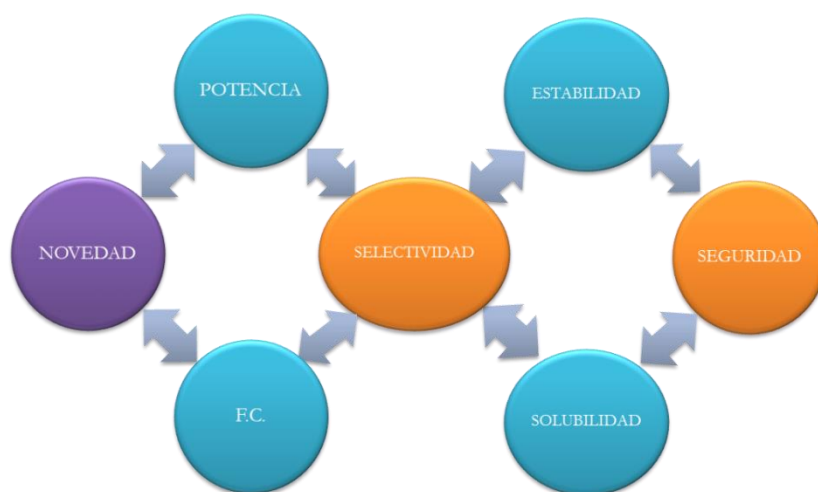


Figura 20. Esquema multivariable del descubrimiento de nuevos fármacos.

La potencia es un punto importante, ya que a mayor potencia menor dosis será requerida para administrar, lo que conlleva menos riesgos de efectos secundarios, menor requerimiento de solubilidad, etc.⁸⁹

Otros apartados que deben analizarse al mismo nivel de magnitud que la potencia son la selectividad y los parámetros farmacocinéticos.

La naturaleza ha desarrollado sistemas muy específicos en los organismos superiores para sus funciones, pero estos, muchas veces se solapan entre ellos y puede acarrear que, al tratar una enfermedad, se produzcan efectos no deseados. Sin embargo, el nivel de selectividad dependerá de: el programa, los posibles efectos fuera de diana, la enfermedad a tratar, la duración del tratamiento, etc. No obstante, la selectividad es uno de los factores más fundamentales a valorar.⁹⁰

Si un compuesto exhibe una potencia adecuada y es selectivo, esto no es indicativo de que sea un cabeza de serie optimizado. Las propiedades fisicoquímicas juegan un papel crucial para poder entrar en la siguiente etapa. Se realizan estudios de ADME *in vitro* para determinar dichas propiedades.⁹¹ Las moléculas con poca solubilidad en medios acuosos, dificultan la producción de nuevos fármacos. Además, hay que evaluar la capacidad para atravesar la membrana celular, ya que si no es posible, no se logrará alcanzar la correspondiente diana y demostrar la eficacia.⁹²

⁸⁹ a) Bauer, R. A. *Drug Discov. Today*. **2015**, 20, 1061-1073. b) Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; Huijsduijn, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14, 751-758.

⁹⁰ a) Huggins, D. J.; Sherman, W.; Tidor, B. J. *Med. Chem.* **2012**, 55, 1424-1444. b) Kawasaki, Y.; Freire, E. *Drug Discov. Today*. **2011**, 16, 985-990. c) Owens, J. *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 1061.

⁹¹ Di, L.; Kerns, E. H. (2016) *Drug-Like properties: concepts, structure design, and methods from ADME to toxicity optimization*. Elsevier.

⁹² Ruiz-García, A.; Bermejo, M.; Moss, A.; Casabo, V. G. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 654-690.

La estabilidad metabólica y química también son factores a valorar.⁹³ Si un cabeza de serie cumple todos los requisitos descritos previamente, pero al ser introducido en el organismo se metaboliza inmediatamente, fallará en la eficacia. Esto suele ocurrir con frecuencia en los antimetabolitos. La estabilidad metabólica dependerá del proyecto. Por ejemplo, un antibiótico interesará que esté dentro del organismo el mayor tiempo posible, mientras que un anestésico se esperará que sea metabolizado con cierta rapidez.⁹⁴ La importancia de la estabilidad química reside en que el fármaco en cuestión no tienda a descomponerse para dar lugar a subproductos no deseados que disminuyan la eficacia y pueden producir reacciones adversas.⁹⁵

Si un cabeza de serie supera todos los requerimientos, tendrá que demostrar su eficacia en sistemas *in vivo*.

1.2.5 FASE PRECLÍNICA

Los resultados positivos *in vitro* son considerados un logro, pero no es indicativo de éxito. Es necesario determinar en un modelo animal el perfil farmacocinético, así como la eficacia para poder llegar a ensayos clínicos en humanos.

No obstante, más sustancial que lo anterior es que el compuesto en estudio muestre un perfil de seguridad y efectos adversos conveniente, ya que si exhiben toxicidad será desechado sin importar todas las etapas anteriores. Una vez más, el perfil de seguridad farmacológico dependerá de la afección. Por ejemplo, en el caso del VIH se lanzaron los primeros medicamentos sin un perfil de seguridad apropiado al ser la única opción que existía en el momento. Recientemente ha ocurrido algo similar con personas infectadas por el virus Ébola. En el otro extremo se encuentran los fármacos utilizados para tratamientos crónicos como la osteoartritis que deberán tener un impacto negativo mínimo.⁹⁶

Queda claro en la fase pre-clínica que un compuesto con un buen perfil toxicológico no asegura que sea comercializado, pero los que sean inadecuados serán abandonados.

1.2.6 FASE CLÍNICA I

El principal objetivo de los ensayos en fase clínica I, es confirmar si el candidato es seguro en humanos. A pesar de las evidencias previas que se puedan tener a través de modelos animales, existen diferencias significativas entre las especies que no pueden ser despreciadas. Al final de este ciclo, la dosis máxima tolerada tiene que haber sido determinada junto con la toxicidad limitante. También se analiza el perfil farmacocinético en humanos, siendo esta información utilizada para seleccionar la dosis en la fase II. La

⁹³ Masimirembwa, C. M.; Bredberg, U.; Andersson, T.B. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 515-528.

⁹⁴ Lu, C. (2014), *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics*. Wiley.

⁹⁵ Kirchmair, J.; Göller, A. H.; Lang, D.; Kunze, J.; Testa, B.; Wilson, I. D.; Glen, R. C.; Schneider, G. *Nature Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 387-404.

⁹⁶ Zhang, D.; Luo, G.; Ding, X.; Lu, C. *Acta Pharm. Sin. B.* **2012**, *2*, 549-561.

población administrada, suelen ser 20-100 pacientes sanos que son observados durante un año o año y medio.⁹⁷

1.2.7 FASE CLÍNICA II

Una vez comprobada la seguridad de una molécula en humanos, puede comenzar la fase II. Los ensayos clínicos están diseñados para obtener datos de eficacia preliminar y conocer si realmente puede ayudar a los pacientes. Todos los pacientes en esta etapa son personas que padecen la enfermedad, se tratan entre 100 y 300 pacientes durante 2 años, dependiendo de la enfermedad. Independientemente de la duración, los pacientes son cuidadosamente seleccionados utilizando estrictos criterios de inclusión y exclusión. El objetivo será determinar la eficacia, sin olvidar el seguimiento de que el compuesto en estudio sigue siendo seguro.⁹⁷

1.2.8 FASE CLÍNICA III

La fase clínica III para una compañía representa un reto y un esfuerzo, ya que requiere la mayor aportación económica. Continuar o no, dependerá en gran medida de los objetivos del programa, si bien existen rasgos comunes en todos ellos.

Lo primero que debe lograrse es demostrar la eficacia y la seguridad del tratamiento en investigación en una población muy superior a los dos procesos anteriores, utilizándose entre 1000 y 3000 pacientes. Puede llevar entre 2.5 y 5 años, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad en estudio. Para superar satisfactoriamente esta etapa, los datos obtenidos deben ser robustos.⁹⁷

1.2.9 FASE CLÍNICA IV

En este punto, la compañía ya ha adquirido la correspondiente licencia y puede comercializar su producto farmacéutico. Durante este período, el fármaco sigue en revisión para ver cómo evolucionan los posibles efectos indeseables a lo largo del tiempo y se compara su eficacia con tratamientos comerciales de los competidores.⁹⁷

1.3 NECESIDAD DE NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS Y EL PORQUÉ DE ESTA TESIS DOCTORAL

A pesar de lo que ha avanzado la química farmacéutica y las soluciones que se han dado a muchas enfermedades, sigue siendo necesario nuevas moléculas que solucionen problemas como: la resistencia, la mejora de perfiles farmacológicos y dar respuesta a enfermedades que aún no tengan solución. A continuación, se detallan algunas de las enfermedades que requieren de nuevas alternativas en su tratamiento.

En el año 2014, la OMS se hacía eco de la acuciante necesidad de soluciones ante la creciente resistencia de los microorganismos a los tratamientos que están disponibles en el mercado.⁹⁸

⁹⁷ Umscheid, C. A.; Margolis, D. J.; Grossman, C. E. *Postgrad. Med.* **2011**, *123*, 194-204.

⁹⁸ World Health Organization. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance.* **2014**.

La rápida emergencia de bacterias resistentes frente a los antibióticos, ha ocurrido a lo largo de todo el mundo. Dicha crisis se asocia con tres factores principalmente. El primero de ellos es la excesiva utilización de antibióticos, que está directamente relacionada con el proceso evolutivo de resistencia.⁹⁹ Debido a la existencia de la transferencia genética horizontal, la resistencia frente a un antibiótico puede ser transferida de una especie a otra, aunque también puede ocurrir de manera espontánea a través de mutaciones. El segundo factor, que está estrechamente ligado al primero, es la incorrecta prescripción de antibióticos. Hay estudios que han mostrado que la elección del medicamento o la duración de la terapia son incorrectas entre el 30% y el 50% de los casos.¹⁰⁰ El tercer punto es el estancamiento al que ha llegado la industria debido a obstáculos regulatorios y económicos (figura 21).¹⁰¹

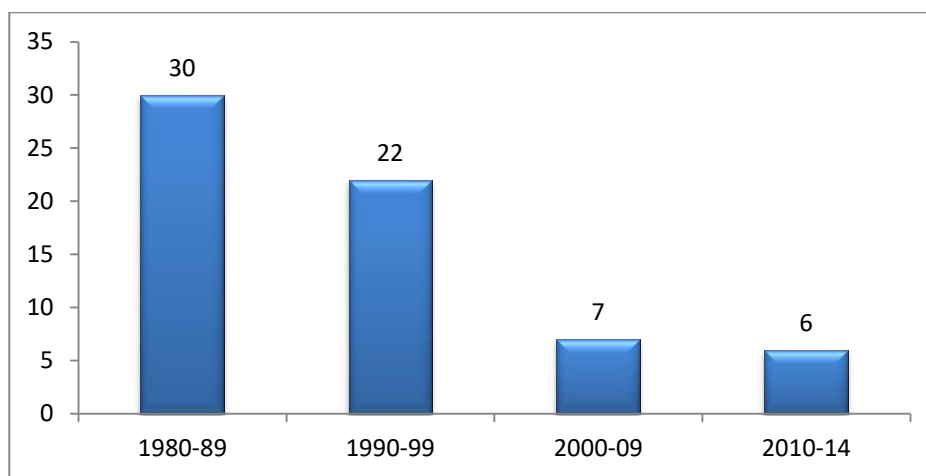


Figura 21. Número de nuevos antibióticos aprobados por intervalo de años.

Muchas de las grandes compañías han abandonado sus programas de búsqueda de antibióticos, porque en el mercado los antibióticos no producen beneficios sustanciales como otras enfermedades crónicas.¹⁰² Recientemente, la OMS ha determinado la lista de bacterias resistentes que tienen prioridad, donde se consideran críticas las bacterias gramnegativas: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.¹⁰³

El informe detallado en 2014 por la OMS también tiene en cuenta las infecciones causadas por hongos, los cuales están empezando a generar mecanismos de resistencia frente a los tratamientos comerciales.⁹⁸ Entre las diferentes especies se han comenzado a observar cepas de *Aspergillus fumigatus* resistentes a azoles y de *Candida glabrata* resistentes a equinocandinas.¹⁰⁴ También se pueden encontrar ciertas especies que son intrínsecamente

⁹⁹ Read, A. F.; Woods, R. J. *Evol Med. Public Health.* **2014**, *1*, 147.

¹⁰⁰ Luyt, C. E.; Brechot, N.; Trouillet, J. L.; Chastre, J. *Crit. Care.* **2014**, *18*, 480.

¹⁰¹ Bartlett, J. G.; Gilbert, D. N.; Spellberg, B. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 1445-1450.

¹⁰² Piddock, L. J. *Lancet Infect. Dis.* **2012**, *12*, 249-253.

¹⁰³ Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. (MIRAR COMO CITAR)

¹⁰⁴ Rivero-Menendez, O.; Alastruey-Izquierdo, A.; Mellado, E.; Cuenca-Etrela, M. J. *Fungi.* **2016**, *2*, 21.

resistentes a los tratamientos como *Candida krusei* al fluconazol.¹⁰⁵ Lo más preocupante son nuevas especies multiresistentes como *Candida auris*.¹⁰⁶ Aunque la prevalencia de la resistencia frente a antifúngicos no está al nivel de la observada en algunas bacterias, las opciones de tratamiento son mucho más limitadas. Por lo que en base a esto, son necesarios nuevos tratamientos que eviten estos problemas de resistencia, además de disminuir los efectos adversos y toxicidades asociados a los antifúngicos disponibles en el mercado.¹⁰⁷

En el mundo, alrededor de 50 millones de personas están infectadas por el VIH, y un número significativo de cepas se han vuelto resistentes a las terapias antirretrovirales. La necesidad de nuevos medicamentos es debida a la ineficiencia del virus en el proceso de replicación, la cual genera mutaciones que contribuyen a generar resistencias que repercuten en el fallo del tratamiento. Surge la necesidad de nuevas dianas y candidatos para el tratamiento del VIH.¹⁰⁸

La quimioterapia es uno de los principales tratamientos para el cáncer, pero su efectividad es limitada debido a la resistencia. La resistencia a quimioterapéuticos puede ser dividido en dos categorías: intrínseca y adquirida. La intrínseca existe antes de recibir quimioterapia; la adquirida surge durante el tratamiento. A pesar de obtenerse nuevos agentes, la capacidad evolutiva de las células tumorales es capaz de eliminar su eficacia, lo que ha ocurrido con Imatinib, frente al cual ciertos tipos de leucemia ya han generado resistencia. Por esta razón, la búsqueda de nuevos agentes antitumorales no se ha detenido desde que comenzó a investigarse, porque a pesar de haberse convertido en una enfermedad crónica para ciertos tumores, otros continúan generando resistencia o aún no poseen tratamiento.¹⁰⁹

El caso de los antiinflamatorios es diferente, ya que los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un grupo diverso de compuestos prescritos para problemas inflamatorios crónicos y agudos. El modo en el que actúan es sobre la enzima ciclooxigenasa (COX). Los AINE son unas de las medicinas más utilizadas en el mundo, pero por sus problemas de seguridad y tolerabilidad, la FDA ha promovido la necesidad de encontrar nuevas alternativas más óptimas y con mejor perfil.¹¹⁰

Se han valorado estos ejemplos, debido a que el objetivo final de la presente tesis doctoral será dar respuesta a algunas de las necesidades planteadas, con el desarrollo de nuevas entidades químicas procedentes y derivadas de la naturaleza.

¹⁰⁵ Walsh, T. J.; Groll, A.; Hiemenz, J.; Fleming, R.; Roilides, E.; Anaissie, E.; *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *64*, 134-140.

¹⁰⁶ Lockhart, S. R.; Etienne, K. A.; Vallabhaneni, S. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *64*, 134-140.

¹⁰⁷ Wiederhold, N. *Infect. Drug. Resist.* **2017**, *10*, 249-259.

¹⁰⁸ Zhang, X. *Acta Pharm. Sin. B.* **2018**, *8*, 131-136.

¹⁰⁹ a) Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer.* **2013**, *13*, 714-726. b) Raguz, S.; Yagüe, E. *Br. J. Cancer.* **2008**, *99*, 387-391.

¹¹⁰ McCarberg, B.; Gibofsky, A. *Cin. Ther.* **2012**, *34*, 1954-1963.

CAPÍTULO 2:
ESTUDIO DE LA
CIANOBACTERIA
Dolichospermum sp.
(GTBC-218)

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 DIVERSIDAD Y ADAPTABILIDAD DE LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias constituyen un grupo diverso y ampliamente distribuido de bacterias gram-negativas, las cuales pueden realizar la fotosíntesis oxigénica. Son capaces de reducir el CO₂ atmosférico para generar carbohidratos con los electrones producidos por la energía solar, con desprendimiento de O₂. Durante su desarrollo, han sido capaces de adaptarse a medios acuáticos y terrestres, incluyendo ambientes extremos.¹ El haber logrado habitar ambientes tan diversos puede ser explicado gracias a su metabolismo, fisiología y estructura celular únicos.

El origen de las cianobacterias data de hace 3.500 millones de años, como sugieren diversos fósiles.² La evolución de las cianobacterias, junto con el progreso de su fotosíntesis oxigénica, tuvo un gran impacto en la composición atmosférica, ya que el CO₂ comenzó a ser asimilado y transformado en diversas moléculas orgánicas. Esto fue acompañado de la oxidación de H₂S gaseoso y el ión ferroso en la corteza terrestre.³ La actividad fotosintética de las primeras especies generó una acumulación gradual de oxígeno en la atmósfera.⁴ Este proceso junto con los eventos endosimbióticos, sentaron la transformación hacia el metabolismo aeróbico y la vida multicelular. Mientras que las proteobacterias se transformaron en las mitocondrias, las cianobacterias dieron lugar a los cloroplastos de las plantas y algas.⁵

Aunque están clasificadas como bacterias gram-negativas, las cianobacterias disponen de una estructura celular diferenciable de otras procariotas (figura 1).⁶ Entre las características a destacar, se distingue una capa de peptidoglicanos más gruesa y una membrana externa distintiva.⁷ La membrana externa posee una composición inusual de polisacáridos y carotenoides fotoprotectores, especialmente necesarios cuando la capa de ozono aún no existía.⁸ El espacio periplasmático de la pared celular está separado del citoplasma por la membrana citoplasmática, donde ocurre la respiración celular.⁹ Las membranas citoplasmáticas, así como los tilacoides de las membranas intracelulares, contienen cadenas hidrocarbonadas (principalmente C₁₅ y C₁₇) en su estructura. Se considera que esto contribuye a incrementar la fluidez de la membrana, el crecimiento y la

¹ Rippka, R.; Waterbury, J. B.; Stanier, R. Y. (1981). Isolation and Purification of Cyanobacteria: Some general Principles. In Mp Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, H. G. Schelegel, eds, The prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. Springer Berlin Heidelberg, Heidelberg, pp 212-220.

² Schopf, J. W. *Science*. **1993**, 260, 640-646.

³ a) Canfield, D. E.; Rosing, M. T.; Bjerrum, C. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* **2005**, 361, 1819-1836. b) Sleep, N. H.; Bird, D. K. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* **2008**, 363, 2651-2664.

⁴ Rantamäki, S.; Meriluoto, J.; Spoof, L.; Puputti, E. M.; Tyystjärvi, T.; Tyystjärvi, E. *Photosynth. Res.* **2016**, 130, 103-111.

⁵ Hedges, S. B.; Blair, J. E.; Venturi, M. L.; Shoe, J. L. *BMC Evol. Bio.* **2004**, 4, 1-9.

⁶ Hoiczky, E.; Hansel, A. J. *Bacteriol.* **2000**, 182, 1191-1199.

⁷ a) Golecki, J. R. *J. Microbiol. Methods*. **1988**, 20, 61-77. b) Jürgens, U. J.; Weckesser, J. *J. Bacteriol.* **1985**, 164, 384-389.

⁸ Resch, C. M.; Gibson, J. J. *Bacteriol.* **1983**, 155, 345-350.

⁹ Pescheck, G. A.; Molitor, V.; Trnka, M.; Wastyn, M.; Erber, W. *Methods Enzymol.* **1988**, 167, 437-449.

actividad fotosintética, especialmente a bajas temperaturas.¹⁰ Aunque aún no se conoce el rol concreto de los hidrocarburos, parece que son de particular importancia en los componentes de los tilacoides, lugar donde ocurre la fotosíntesis.¹¹



Figura 1. Componentes celulares de las cianobacterias.

Todas las cianobacterias pueden realizar la fotosíntesis oxigénica por medio de dos sistemas entrecruzados (I y II), los cuales se encuentran en la membrana de los tilacoides. A pesar de esto, pueden desarrollar diferentes modos metabólicos en función de las condiciones medioambientales, yendo de un crecimiento fotoautótrofo a uno estrictamente heterótrofo.¹² La mayoría crecen en hábitats con suficiente CO₂ y luz, manifestando un metabolismo fotoautótrofo. La fijación de carbono ocurre en compartimentos especializados denominados carboxisomas y la reacción esencial es catalizada por la enzima RuBisCo en el ciclo de Calvin-Benson-Bassham.¹³ También, se ha observado un modo de metabolismo auxiliar en el que reducen azúcares para obtener energía; esto ocurre cuando no se dan las condiciones de luz adecuadas para realizar la fotosíntesis.¹⁴

Existen fundamentalmente cuatro formas morfológicas diferentes en estos microorganismos: unicelulares, colonias y dos tipos de formas filamentosas, las que presentan heterocistos y las que no. Algunos ejemplos son: *Cyanotheca* (figura 2a, unicelular), *Microcystis* (figura 2b, colonia), *Phormidium* (figura 2c, filamentosas sin heterocisto) y *Anabaena* (figura 2d, filamentosas con heterocisto).

¹⁰ a) Schirmer, A.; Rude, M. A.; Li, X.; Popova, E.; del Cardayre, S. B. *Science*. **2010**, 329, 559-562. b) Berla, B. M.; Saha, R.; Maranas, C. D.; Pakrasi, H. B. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 14894.

¹¹ Mullineaux, C. W. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2014**, 1837, 503-511.

¹² Ripka, R. *Archiv. für Mikrobiologie*. **1972**, 87, 93-98.

¹³ Bassham, J. A.; Benson, A. A.; Calvin, M. J. *Biol. Chem.* **1950**, 185, 781-787.

¹⁴ a) Vonshak, A.; Chen, F. J. *Phycol.* **2000**, 36, 675-679. b) Kämäräinen, J.; Huokko, T.; Kreula, S.; Jones, P. R.; Aro, E. M.; Kallio, P. *New. Phytol.* **2017**, 214, 194-204.

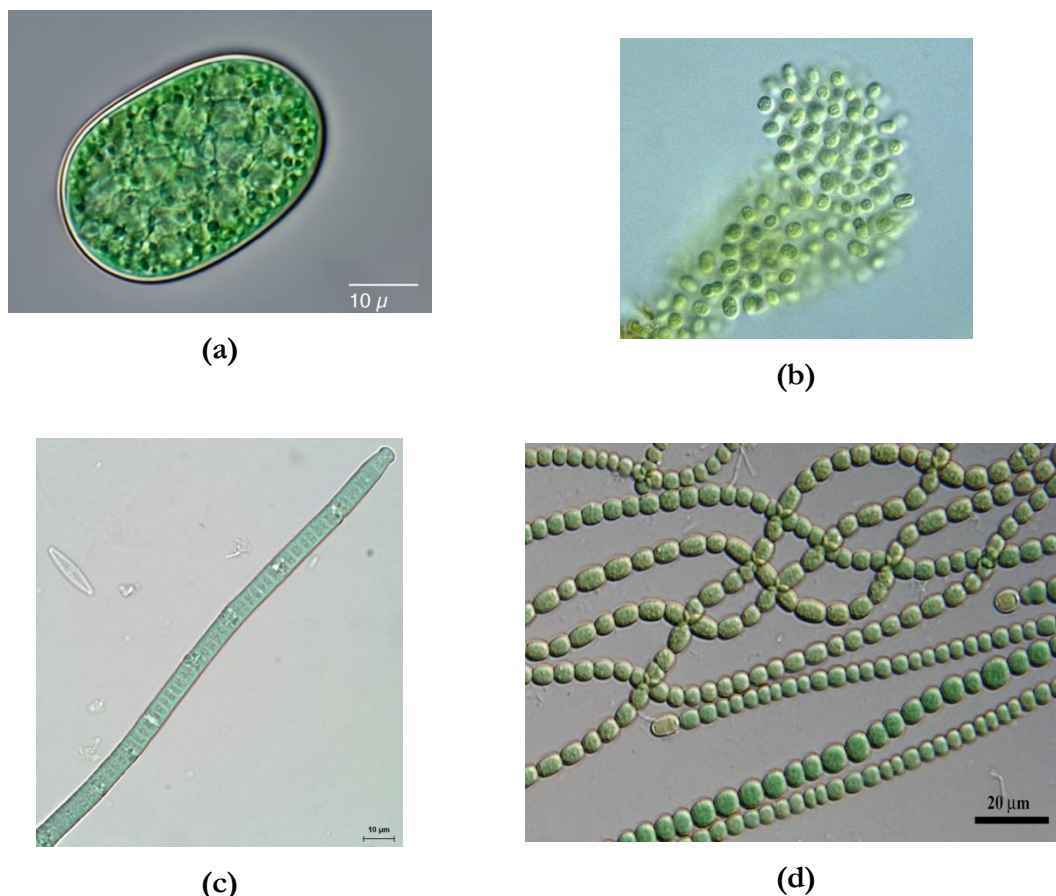


Figura 2. Principales formas morfológicas en cianobacterias.

2.1.2 CIANOBACTERIAS EXTREMÓFILAS

Las cianobacterias se han adaptado a lo largo de su evolución a las condiciones ambientales más adversas, desde una atmósfera anóxica a una atmósfera oxidante, cambios bruscos de temperatura y un amplio rango espectral de luz. Durante todos estos procesos, se han alzado como uno de los organismos extremófilos más versátiles en la Tierra. Los extremófilos son clasificados en varias categorías dependiendo de las características del medio en el que viven.

Las cianobacterias termófilas son aquellas resistentes a altas temperaturas y pueden llegar a vivir en manantiales geotérmicos. La temperatura máxima a la cual se desarrollan oscila entre 73-74°C. Se ha observado que las especies filamentosas son, por lo general, menos termo-tolerantes.¹⁵

La información de cianobacterias psicrófilas fue recogida por primera vez en la Antártida. Se han encontrado un amplio rango de especies, tanto unicelulares como filamentosas, y su desarrollo de crecimiento es mucho más lento. En este medio logran

¹⁵ a) Brock, T. D. (1978) *Thermophilic Microorganisms and life at hightemperature*. Springer verlag, New York, pp 465. b) Sompong, U.; Hawkins, P. R.; Besley, C.; Peerapornpisal, Y. *Microbiol. Ecol.* **2005**, 52, 365-376. c) Ward, D. M.; Castenholz, R. W. (2000) Cyanobacteria in geothermal habitats. In: Whitton, B. A.; Potts, M. *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic, Netherlands.

sobrevivir gracias a su tolerancia a la desecación, congelación y adaptación a bajos niveles de nutrientes.¹⁶

La presencia de altas concentraciones salinas no excluye que pueda ocurrir la fotosíntesis oxigénica, y algunas cianobacterias son capaces de prosperar en concentraciones cercanas a la saturación. Se han descrito diversas especies unicelulares y filamentosas tolerantes a estos medios. Las variedades halófilas y halotolerantes mantienen sus concentraciones iónicas intracelulares a relativas bajas concentraciones, aunque iones como K^+ y Cl^- pueden atravesar la membrana e incrementar la salinidad del medio. Algunas especies producen solutos orgánicos para regular la ósmosis.¹⁷

En los lagos soda, en el este de África, se ha reportado la presencia de cianobacterias adaptadas a medios fuertemente alcalinos. Cabe mencionar en este apartado a la bacteria alcalófila *Plectonema nostocorum*, que con su capacidad para vivir a pH 13, es la forma de vida que vive a un pH más básico. Se ha determinado que el ión Na^+ está involucrado en la homeostasis del pH a través de la actividad antiportadora Na^+/H^+ .¹⁸

Las membranas celulares de las cianobacterias pueden ser vistas como intercambiadores de iones naturales debido a la cantidad de iones aniónicos que poseen en su superficie, lo que las permite fijar iones metálicos. Este proceso da respuesta a su capacidad para tolerar metales tóxicos.¹⁹

El interés de las especies extremófilas reside en que, gracias a sus capacidades de supervivencia únicas, pueden ser utilizadas en diversos campos de investigación y desarrollo.

2.1.3 APLICACIONES NO TERAPÉUTICAS DE LAS CIANOBACTERIAS

En la actualidad, existen diversos procedimientos bioindustriales basados en bacterias heterotróficas para producir materiales químicos de alto valor añadido. Sin embargo, la viabilidad económica está limitada al coste de los sustratos carbonados utilizados en la fermentación. Las cianobacterias, gracias a su capacidad para fijar el CO_2 , disponen de la maquinaria biosintética adecuada para la obtención de diversos productos químicos y biocombustibles. A diferencia de las bacterias heterótrofas, solo requieren de

¹⁶ a) Vincent, W. F. (2000). *Cyanobacterial dominance in the polar region*. In: Whitton, B. A.; Potts, M. (eds). The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 321-340. b) Jungblut, A. D.; Hawes, L.; Mountfory, D.; Hltzfeld, B.; Dietrich, D. R.; Burns, B. P.; Neilan, B. A. *Env. Microbiol.* **2005**, *7*, 519-529.

¹⁷ a) Reed, R. H.; Borowitzka, L. J.; Mackey, M. A.; Chudak, J. A.; Foster, R.; Warr, S. R. C.; Moore, D. J.; Stewart, W. D. P. *Microbiol. Lett.* **1986**, *39*, 51-56. b) Sorensen, K. B.; Canfield, D. E.; Oren, A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1608-1616. c) Oren, A. (2000). *Salt and brines*. In: Whitton, B. A.; Potts, M. (eds) The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. 306. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 281.

¹⁸ a) Grant, W. D.; Tindall, B. J. (1986). *The alkaline saline environment*. In: Herbert, R. A.; Codd, G. A. (eds). Microbes in extreme environments. Academic, London, pp 25-54. b) Boussiba, S.; Wu, X.; Zarka, A. (2000) *Alkaliphilic cyanobacteria*. In: Seckbach, J. (ed) Journey to diverse microbial worlds: adaptation to exotic environments. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 209-224.

¹⁹ a) Schiewer, S.; Volesky, B. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 2921-2927. b) De Philippis, R.; Sili, C.; Peperi, R.; Vincenzini, M. *J. Appl. Phycol.* **2001**, *13*, 293-299.

luz solar, CO₂, agua y una mínima cantidad de nutrientes para crecer, eliminando el coste de los sustratos carbonados y medios de cultivo complejos.²⁰

A causa del agotamiento de los combustibles fósiles, se están buscando alternativas para ser reemplazados con: etanol, 1-butanol, isobutanol, hidrógeno y alcanos. Aunque algunas cepas de cianobacteria producen de manera natural pequeñas cantidades de etanol como subproducto de la fermentación, es necesario mejorar la eficiencia para que sea económicamente viable.²¹ En cepas de *Synechocystis* sp. se ha logrado la formación de etanol fotosintéticamente mediante ingeniería genética.²² El isobutanol y 1-butanol son considerados mejores alternativas debido a: su mayor densidad energética, ser menos corrosivos y menos volátiles.²³ Utilizando modificación genética, se ha llegado a la producción fotosintética directa en *Synechococcus elongatus* de isobutiraldehído e isobutanol.²⁴ Se han descrito más de 14 géneros diferentes capaces de producir hidrógeno bajo condiciones de cultivo, entre las que se incluyen *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* o *Nostoc*.²⁵ El hidrógeno en las cianobacterias es un subproducto de la fijación de nitrógeno cuando éste se encuentra muy limitado. La producción de hidrógeno está facilitada por la actividad reversible de las hidrogenasas; no obstante, la aplicación industrial de este proceso aún está muy limitada.²⁶ Es conocido que las cianobacterias producen alcanos y alquenos que tienen propiedades adecuadas para ser utilizados como combustibles. Las enzimas involucradas en dicho proceso han sido transferidas a *E. coli*, logrando la producción de alcanos en dicha bacteria.²⁷

Recientemente, el tratamiento de aguas residuales con cianobacterias ha atraído mucho interés científico y técnico. Esta especie se caracteriza por su habilidad para oxidar aceites, compuestos orgánicos complejos y acumular iones metálicos, como zinc, cobalto o cobre.²⁸ Gracias a estas propiedades, podrían ser útiles para el tratamiento de desechos urbanos, agrícolas e industriales. Cianobacterias del género *Oscillatoria*, *Phormidium* y *Westiellpsis* han sido utilizadas para eliminar iones nitrogenados y fosfatos de aguas residuales.²⁹ Las cepas de *Spirulina* poseen diferentes grupos funcionales en su superficie:

²⁰ Dismukes, G. C.; Carrieri, D.; Bennette, N.; Ananyev, G. M.; Posewitz, M. C. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 235-240.

²¹ Deng, M. D.; Coleman, J. R. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 523-528.

²² Dexter, J.; Fu, P. *Energy Environ. Sci.* **2009**, *8*, 857-864.

²³ Ducat, D. C.; Way, J. C.; Silver, P. A. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 95-103.

²⁴ Atsumi, S.; Hanai, T.; Liao, J. C. *Nature*. **2008**, *451*, 86-89.

²⁵ a) Chen, M.; Li, L.; Zhang, L. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1-9. b) Leino, H.; Shunmugam, S.; Isojärvi, J. *Int. J. Hydrog. Energy*. **2014**, *17*, 8983-8991.

²⁶ a) Tamagnini, R.; Axelsson, P.; Lindberg, F. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 1-20. b) Kumaraswamy, G. K.; Guerra, T.; Qian, X.; Zhang, S.; Bryant, D. A.; Dismukes, G. C. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *77*, 3722-3731.

²⁷ a) Mendez-Perez, D.; Begermann, M. B.; Pflieger, B. F. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 4264-4267. b) Seen, E. J.; Kang, Y.; Bokisky, G. *Nature*. **2010**, *329*, 559-562.

²⁸ Mohapatra, H.; Gupta, R. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 1387-1398.

²⁹ a) Blier, R.; Laliberté, G.; de la Noue, J. *Bioresour. Technol.* **1995**, *52*, 151-155. b) de la Noüe, J.; Basseres, A. *Biol. Waste.* **1989**, *29*, 17-31. c) Pouliot, Y.; Buelna, G.; Racine, C.; de la Noüe, J. *Biol. Waste.* **1989**, *29*, 81-91.

carboxilos, hidroxilos, sulfatos y otros grupos cargados que pueden actuar como quelato. Este hecho hace que tengan gran potencial en el tratamiento de residuos metálicos.³⁰

Teniendo en cuenta el gran potencial de estos microorganismos en aplicaciones biotecnológicas, es de gran relevancia científica conseguir trasladar todos estos resultados a gran escala y que sean económicamente viables.

2.1.4 APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS CIANOBACTERIAS

Aunque muestran interés en diversos campos, donde realmente destacan es en su capacidad para generar compuestos orgánicos con actividad biológica. No están especializadas en la producción de ningún tipo de metabolito secundario en particular, habiéndose detectado la presencia de: lipopeptidos (40.2 %), aminoácidos (5.6%), ácidos grasos (4.2%), macrólidos (4.2%), amidas y otros (9.4%).³¹ Estos han mostrado un amplio espectro de actividades biológicas, como son: antibacteriana, antifúngica, antiviral o anticancerígena. Todas estas moléculas son indicativas del potencial farmacéutico que presentan las cianobacterias.³²

El screening de extractos como antitumorales se comenzó a lo largo de la década de los años 90 y desde entonces se han encontrado una gran diversidad de metabolitos con interés clínico. Las criptoficinas, son potentes anticancerígenos producidos por las cianobacterias. La criptoficina 1 (figura 3, I) aislada de *Nostoc* sp. GSV224, resultó ser entre 100 y 1000 veces más potente que diferentes fármacos comerciales, como el taxol o la vinblastina.³³ Desde su descubrimiento se han desarrollado diferentes análogos sintéticos para ser llevados a uso clínico, siendo el más prometedor LY-355073.³⁴ La curacina A (figura 3, II), aislada de *Lyngbya majuscula*, mostró una fuerte afinidad por la tubulina. No obstante, debido a la solubilidad, su bioactividad no pudo ser demostrada en modelos animales.³⁵ Actualmente, se continúa la búsqueda de derivados para uso clínico.³⁶ La dolastatina 10 (figura 3, III), también ha exhibido actividad inhibitoria de la tubulina y se conforma de un pentapéptido que contiene cuatro aminoácidos únicos: dolavalina, dolaisoleucina, dolaprolina y dolafenina. A pesar de haberse desarrollado clínicamente, tuvo que abandonarse en fase clínica II, por sus efectos adversos. Un análogo de dolastatina 10, TZ-1027 consiguió superar la fase II sin efectos adversos, pero su estudio fue detenido en esta etapa. El derivado de dolastatina 10 que sí ha sido capaz de llegar al mercado es brentuximab vedtoin (Adcetris), aprobado por la FDA en 2011 para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y otros linfomas.³⁷ Apratoxina A (figura 3, IV), es un depsipeptido

³⁰ Balaji, S.; Kalaivani, T.; Rajasekaran, C. *Soil, Air, Water*. **2014**, *42*, 507-512.

³¹ Singh, R. K.; Tiwari, S. P.; Rai, A. K.; Mohapatra, T. M. *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 401-412.

³² a) Jaspars, M.; Lawton, L. A. *Curr. Opin. Drug. Dis. Dev.* **1998**, *1*, 77-84. b) Devillers, J. *Environ. Res.* **2007**, *18*, 629-643.

³³ Patterson, G. M. *J. Phycol.* **1991**, *27*, 530-536.

³⁴ Yousong, D.; Seufert, H.; Zachary, Q. B.; David, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5492-5498.

³⁵ Gerwick, W. H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1243-1245.

³⁶ Shakeel, E.; Arora, D.; Jamal, Q. M.; Akhtar, S.; Khan, M. K.; Kamal, M. A.; Siddiqui, M.; Lohani, M.; Arif, J. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 523-543.

³⁷ Minich, S. S. *Ann. Pharmacother.* **2012**, *47*, 377-383.

cíclico aislado de *Lyngbya sp.*³⁸ y con actividad citotóxica en líneas tumorales humanas con valores IC₅₀ que se encuentran entre 0.36 y 0.52 nM *in vitro*.³⁹

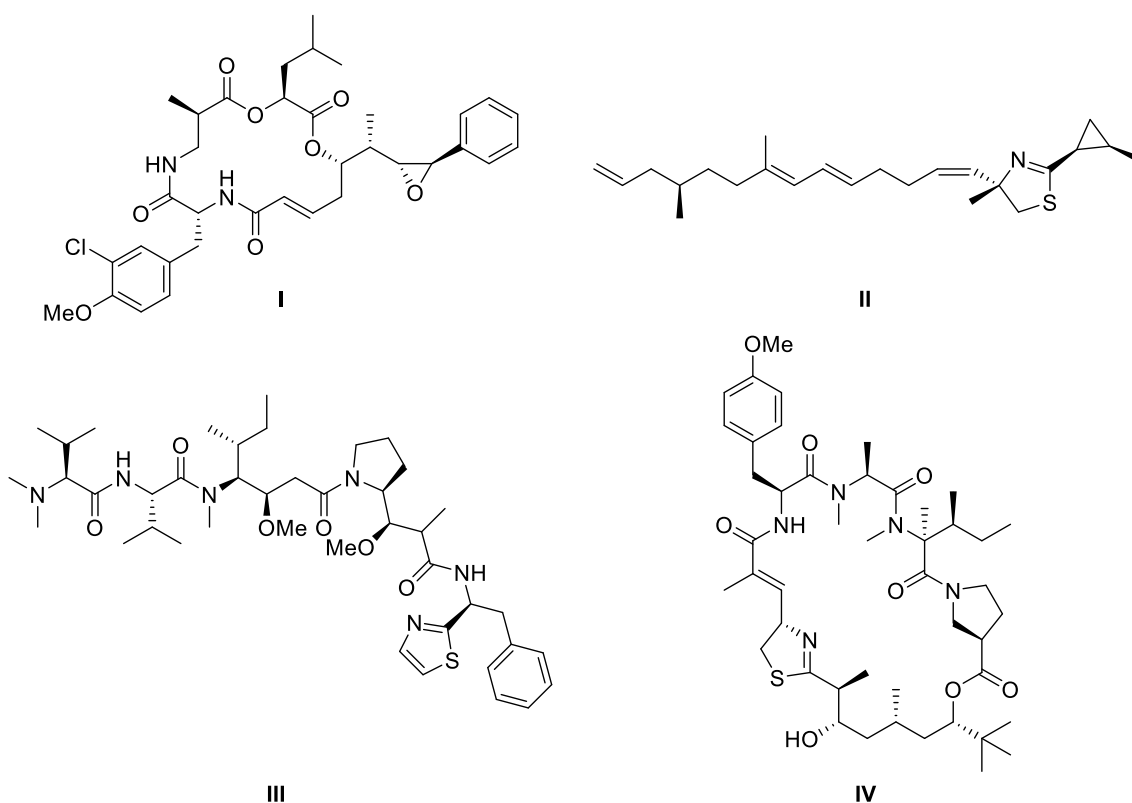


Figura 3. Moléculas antitumorales aisladas de cianobacterias.

En el caso de los antivirales, se han encontrado tres familias: polisacáridos, lectinas y sulfoglicolípidos. De los polisacáridos, spirulano y Ca-spirulano procedentes de *Spirulina sp.* mostraron actividad frente a HIV-1, HIV-2, influenza y diferentes virus con cápsida vírica. Su modo de actuación es evitar que el virus se pueda unir y fusionar a la célula hospedadora.⁴⁰ Entre las lectinas, destacan cianovirin-N (figura 4, **V**) y scitovirin (figura 4, **VI**); estas proteínas interfieren en la fusión viral. Cianovirin es un polipéptido de 101 aminoácidos de longitud identificado por primera vez en *Nostoc ellipsosporum* y con potente actividad demostrada, tanto *in vitro* como *in vivo*, a concentraciones nM.⁴¹ Actualmente, se encuentra comercializada en forma de gel por los laboratorios Cellegy.⁴² Scitovirina es un polipeptido de 95 aminoácidos, obtenido por primera vez de *Scytonema varium* y es capaz de inactivar el virus a concentraciones nM bajas.⁴³ Finalmente,

³⁸ Leusch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Corbett, T. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5418-5423.

³⁹ Leusch, H. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 158-166.

⁴⁰ Feldmann, S. C.; Reynaldi, S.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S.; Damont, E. B. *Phytomedicine*. **1999**, 6, 335-340.

⁴¹ Boyd, M. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 1521-1530.

⁴² Klasse, P. J.; Shattock, R.; Moore, J. P. *Ann. Rev. Med.* **2008**, 59, 455-471.

⁴³ Bokesch, H. R. *Biochem.* **2003**, 42, 2578-2584.



34

investigación ha identificado las cibastacinas (figura 5, **XII**), una nueva familia de sesterterpenoides pentacíclicos con un resto guanidina, a partir de *Nostoc* sp.⁴⁹ Esta familia exhibió actividad moderada frente a bacterias del tipo gram-positivas. La eucapsitriona (figura 5, **XIII**) es un derivado de antraquinona aislado de *Eucpasis* sp. y tiene capacidad para inhibir *Micobacterium tuberculosis*.⁵⁰

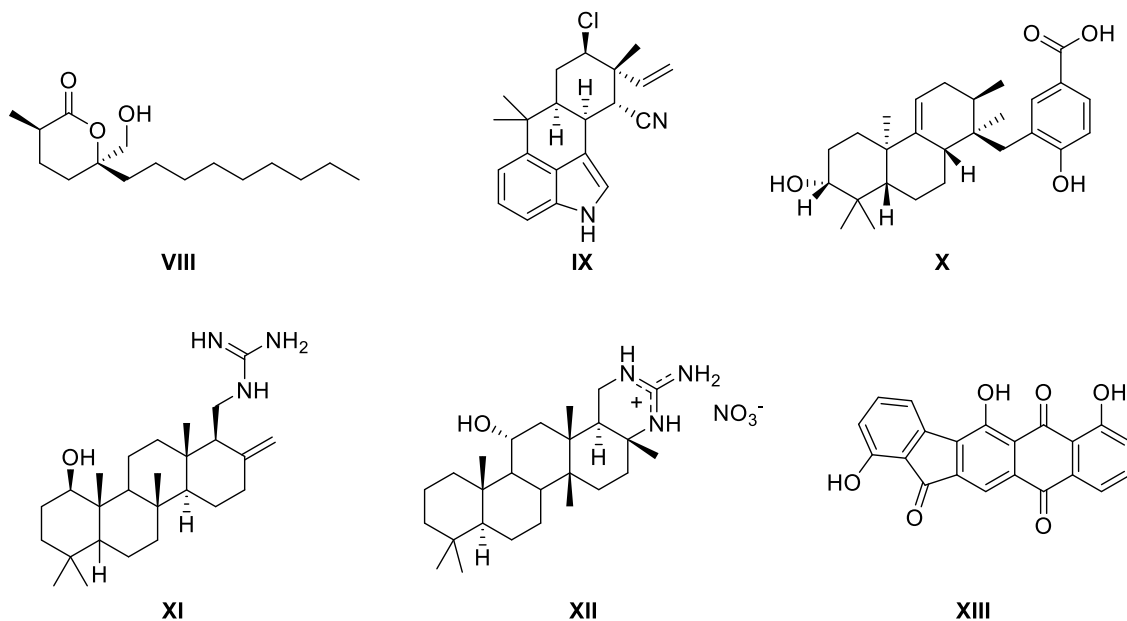


Figura 5. Metabolitos secundarios de cianobacterias con actividad antibacteriana.

De manera similar a lo que ocurre con los antibacterianos, algunos de los antifúngicos descubiertos en cianobacteria también manifiestan citotoxicidad inherente. Pero existe una serie de moléculas en las que se ha observado baja o nula toxicidad. Tolibisidina A, procedente de *Tolypothrix byssoidea*, presentó actividad moderada frente a *Candida albicans*.⁵¹ Fischerelina A (figura 6, **XIV**) obtenida de *Fischerella muscicola*, resulta muy interesante desde el punto estructural ya que tiene un enedieno y dos heterociclos, pero su actividad antifúngica sólo era moderada.⁵² El ácido majusculoico (figura 6, **XV**), exhibió actividad frente a *C. albicans* con CMI de 8 μ M. Sin embargo, las especies resistentes a fluconazol, también fueron resistentes al ácido.⁵³ Los tjipanazoles, como el tjipanazol A1 (figura 6, **XVI**), provenientes de *Tolypothrix tjipanasensis* y *Fischerella ambigua*, exhibieron actividad significativa frente a diferentes hongos fitopatogénicos, a diferencia de otros indolcarbazoles que han mostrado baja actividad.⁵⁴ El alcaloide carriebowlinol

⁴⁹ Cabanillas, A. H.; Pérez, V. T.; Corral, S. M.; Valencia, R. D. F.; Quintana, A. M.; Doménech, M. O.; Sánchez, A. R. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 410-413.

⁵⁰ Sturdy, M.; Kronic, A.; Cho, S.; Franzblau, S.; Orjala, J. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1441-1443.

⁵¹ Jaki, B.; Zerbe, O.; Heilman, J.; Sticher, O. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 154-158.

⁵² Hagmann, L.; Jütner, F. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6539-6542.

⁵³ MacMillan, J. B.; Molinski, T. F. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 604-606.

⁵⁴ Bonjouklian, R.; SmitskLarry, T. A.; Doolin, E.; Molloy, M.; Stacey, M. D.; Shaffer, S. A.; Moore, R. E.; Stewart, J. B.; Patterson, G. M. L. *Tetrahedron*, **1991**, *37*, 7739-7750.

(figura 6, **XVII**) que ha sido identificado en una cianobacteria sin clasificar, manifestó actividad antifúngica moderada.⁵⁵

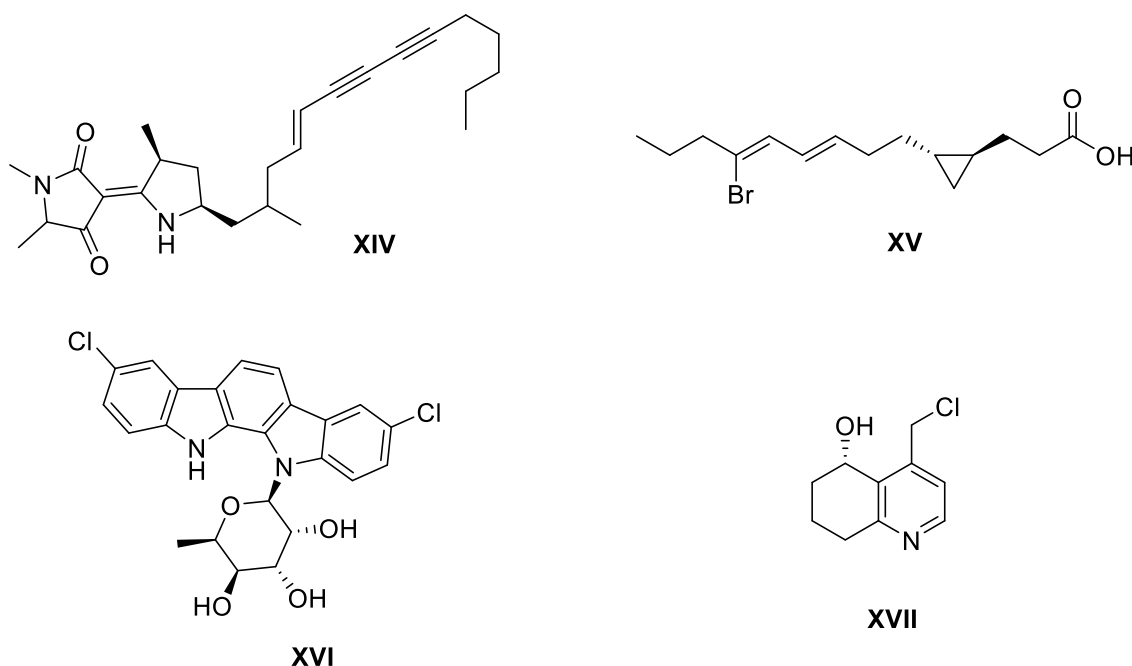


Figura 6. Metabolitos secundarios de cianobacterias con actividad antifúngica.

El objetivo de este apartado ha sido dar a conocer algunas de las moléculas más relevantes en cianobacterias que mantienen relación con las actividades biológicas que se detallarán en este capítulo. Sin embargo, la diversidad, tanto a nivel estructural como biológica, es tan amplia y variada, que no es posible englobarlas todas aquí. Entre las actividades terapéuticas no reseñadas destacan: neurotóxica,⁵⁶ antiinflamatoria,⁵⁵ antiparasitaria,^{31,55,57,58} inmunomoduladora,³¹ e inhibidora de CB-1 y CB-2.⁵⁸

2.1.5 VALORALIA I MÁS D

Ante la acuciante necesidad de encontrar nuevas sustancias activas frente a diferentes enfermedades y gracias al potencial que presentan las cianobacterias, surge en 2007 la empresa biotecnológica Valoralia I más D. La empresa dispone de una colección específica (GTBC) que incluyen más de 200 cepas activas frente a agentes infecciosos (bacterias, virus y hongos) y antitumorales, que han sido recolectadas, preferiblemente, de ambientes extremos. De esta colección, el 20% son compradas o cedidas de otras colecciones y el 80% restante, obtenidas por la propia empresa en diferentes localizaciones del mundo.

⁵⁵ Soares, A. R.; Engene, N.; Gunasekera, S. P.; Sneed, J. M.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 534-538.

⁵⁶ Nunnery, J. K.; Mevers, E.; Gerwick, W. H. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 787-793.

⁵⁷ Niedermeyer, T. H. *Planta Med.* **2015**, *81*, 1309-1325.

⁵⁸ Shah, S. A.; Akhter, N.; Auckloo, B. N.; Khan, I.; Lu, Y. Wang, K.; Wu, B.; Guo, Y. W. *Mar. Drugs.* **2017**, *15*, 1-30.

La principal área de investigación está enfocada al desarrollo de futuros fármacos, utilizando los productos naturales de las cianobacterias. Para esto, la compañía ha desarrollado una importante especialización en tres puntos clave del proceso:

1. Aislamiento, cultivo y mantenimiento de cepas.
2. Ensayo primario de bioactividades.
3. Obtención de moléculas orgánicas mediante técnicas de separación y elucidación estructural.

En una segunda área de investigación, la compañía posee un amplio portafolio de nuevas moléculas generadas mediante síntesis química, con baja o nula toxicidad.

2.2 OBJETIVOS

Debido al interés terapéutico que suscita la cepa GTBC-218, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Realizar la separación y análisis químico de la cianobacteria *Dolichospermum* sp. (GTBC-218).
- 2) Determinar estructuralmente el metabolito o metabolitos responsables de su actividad biológica.
- 3) Valorar la actividad biológica de los metabolitos, analizando tanto la actividad terapéutica como los parámetros de citotoxicidad.
- 4) Generar una quimioteca de los componentes químicos presentes en la cepa *Dolichospermum* sp., para futuros procesos de desreplicación.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA CEPA GTBC-218

Dolichospermum sp. (GTBC-218) fue recolectada en el océano Atlántico, Islas Canarias, y crecida en condiciones axénicas en los laboratorios de Valoralia I más D. La biomasa liofilizada fue extraída con disolventes orgánicos, obteniéndose un extracto crudo orgánico (EO-218).

El extracto EO-218 fue ensayado, por parte de la empresa, sobre diferentes líneas de actividad biológica de interés. Las pruebas iniciales del extracto crudo exhibieron actividad antifúngica (tabla 1), de baja a moderada, tanto en levaduras (*Candida albicans* y *Candida parapsilosis*) como en hongos filamentosos (*Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus terreus*). La actividad más potente fue detectada frente a células tumorales (tabla 1) con una actividad inhibitoria de 50 µg/mL para células de carcinoma colorrectal humano, HT29, y de 10 µg/mL para adenocarcinoma de mama tipo luminal, AU-565.

Tabla 1. Ensayos iniciales de bioactividad para EO-218.

| Antifúngico* | | Antitumoral | |
|------------------------|-----------|---------------|------------------------|
| Especie | Halo (mm) | Línea celular | C. inhibitoria (µg/mL) |
| <i>C. albicans</i> | 9 | HT-29 | 50 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 14 | AU-565 | 10 |
| <i>A. fumigatus</i> | 12 | | |
| <i>A. terreus</i> | 30 | | |

* 1,5 mg/disco.

2.3.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO EO-218

El extracto EO-218 se sometió a un primer fraccionamiento mediante cromatografía en columna de sílica, utilizando como eluyentes: heptano-AcOEt (1:1), CH₂Cl₂-MeOH (20:1) y, finalmente, CH₂Cl₂-MeOH (5:1), obteniéndose cuatro fracciones (A-D), que fueron sometidas a diferentes bioensayos (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de los bioensayos realizados sobre el fraccionamiento inicial.

| Fracción | Antifúngica | AntiVIH | Antitumoral | Antioxidante | Antiinflamatorio |
|----------|-------------|---------|-------------|--------------|------------------|
| A | | | | | |
| B | | | | | |
| C | | | | | |
| D | | | | | |

No activo

Actividad moderada

Actividad alta

2.3.3 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN EO-218 A

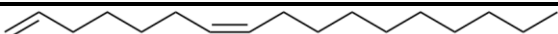
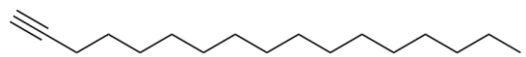
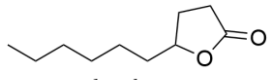
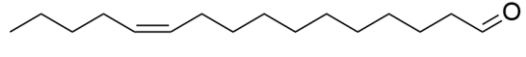



La fracción más apolar del crudo EO-218, fracción A, no exhibió actividad biológica frente a ninguna de las líneas. No obstante, se decidió abarcar su estudio debido al interés estructural que podrían presentar los metabolitos constituyentes de esta fracción, al poder tener relación estructural o ser precursores de los componentes activos. Para su análisis, se realizó un nuevo fraccionamiento con heptano-AcOEt (5:1), obteniéndose dos fracciones **EO-218 A-I** y **EO-218 A-II**, que fueron analizadas por RMN-H¹ y cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS).

2.3.3.1 Fracción EO-218 A-I

La observación inicial del espectro de RMN-H¹ de EO-218 A-I, (ver anexo, figura A-1) mostró, de manera predominante, un compuesto, y como señales más características una serie de tripletes en la región δ_H 0.86-0.90, propios de grupos metilos terminales de cadenas alquílicas; un multiplete ancho a δ_H 1.26, característico de grupos metilenos alifáticos y un multiplete en la región de δ_H 5.3-5.4, asignable a CHs de tipo olefinicos. Estos datos espectroscópicos suelen ser característicos de: alcanos, ceras o ácidos carboxílicos de cadena larga, los cuales se adecúan a la polaridad de la fracción.

Ante la imposibilidad de analizar la mezcla por RMN, se decidió llevar a cabo su análisis por GC/MS. En el cromatograma (ver desarrollo experimental, 2.5.5.1) se observaban 7 picos, en el cual, los 2 componentes mayoritarios de la mezcla aparecían a $t_R = 19.06$ min y $t_R = 19.22$ min. En la tabla 3 se muestran los correspondientes componentes de la mezcla.

Tabla 3. Metabolitos hallados en la fracción EO-218 A-I.

| n° | t_R (min) | Estructura química | Fórmula molecular |
|----|----------------|--|----------------------|
| 1 | 7.81 |  1,7Z-hexadecadieno | $C_{17}H_{32}$ |
| 2 | 7.90 |  1-heptadecino | $C_{17}H_{32}$ |
| 3 | 9.29 |  γ -decalactona | $C_{10}H_{18}O$ |
| 4 | 10.37 |  Z-11-hexadecenal | $C_{16}H_{30}O$ |
| 5 | 11.38 |  tetradecano | $C_{14}H_{30}$ |
| 6 | 19.06 |  1-docoseno | $C_{22}H_{44}$ |
| 7 | 19.22 |  nonadecano | $C_{19}H_{40}$ |

Los datos cromatográficos confirmaron que la fracción se componía mayoritariamente de hidrocarburos de cadena larga, siendo los principales componentes de la mezcla, 1-docoseno (6) y nonadecano (7). Todos los metabolitos determinados han sido identificados previamente en cianobacterias. El nonadecano (7) ha sido aislado de *Synechocystis* sp.,⁵⁹ *Arthrospira platensis*,⁶⁰ *Arthrospira maxima*,⁶⁰ y *Fischerella ambigua*.⁶¹ El 1-docoseno (6) ha sido observado en *Spirulina*,⁶² *Mycrocystis aeruginosa*,⁶³ y *Oscillatoria f. granulata*.⁶⁴ El tetradecano (5) se encontró en cianobacterias del género *Spirulina platensis*,⁶⁵ *Nostoc* spp.⁶⁵ y *Anabaena*.^{65,66} El heptadecino (2) está presente en *Scytonema* sp.,⁶⁷

⁵⁹ Guan, W.; Zhu, T.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Jing, Z.; Wang, C. *J. Chromatogr. B.* **2016**, 1029, 113-120.

⁶⁰ Elkasabi, Y.; Chagas, B. M. E.; Mullen, C. A. Boateng, A. A. *Energy Fuels.* **2016**, 30, 4925-4932.

⁶¹ Devi, K. M.; Mehta, S. K. *World J. Pharm. Res.* **2016**, 2, 199-208.

⁶² a) Ramasamy, V.; Gopalakrishnan, V. K. *Int. J. Pharm. Phytopharmacol.* **2013**, 3, 239-244. b) Kumar, V.; Bhatnagar, A. K.; Srivastava, J. N. *J. Med. Plants. Res.* **2011**, 5, 7043-7048.

⁶³ Zhai, C.; Song, S.; Zou, S.; Liu, C.; Xue, Y. *Freshw. Biol.* **2013**, 58, 1831-1839.

⁶⁴ Matsumoto, A. Tsuchiya, Y. *Wat. Sci. Tech.* **1999**, 6, 245-250.

⁶⁵ Milovanovic, I.; Misan, A.; Simeunovic, J.; Kovac, D.; Jambrec, D.; Mandic, A. *J. Chem.* **2015**, 1-6.

⁶⁶ a) Bhattacharyya, S.; Deep, P. R.; Nayak, B.; Panigrahi, M.; Mohapatra, B. *Int. J. Med. Arom. Plants.* **2013**, 3, 283-292.

⁶⁷ Dembitsky, V. M.; Srebnik, M. *Biochemistry.* **2002**, 67, 1276-1282.

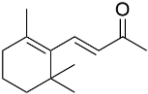
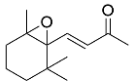
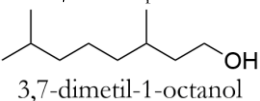
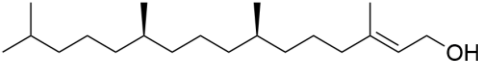
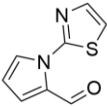
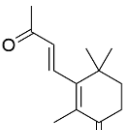
Synechocystis sp.,⁶⁸ *Anabaena* sp.,⁶⁸ y *Synechococcus elongatus*.⁶⁸ 1,7-Z-hexadecadieno (**1**) también fue encontrado en las especies *Synechocystis* sp.,⁶⁸ *Anabaena* sp.,⁶⁸ y *Synechococcus elongatus*.⁶⁸ El Z-11-hexadecenal (**4**) se encuentra en cepas de *Cyanobee* y *S. elongatus*.^{24,27} La γ -decalactona (**3**) únicamente ha sido hallada en *H. fontinalis*.⁶⁹ Aunque no hay ninguna referencia acerca de su función en cianobacterias, esta lactona es conocida por sus diversos usos como fragancia en diversos sectores como el cosmético, alimenticio o farmacéutico.⁷⁰

2.3.3.2 Fracción EO-218 A-II

El espectro de RMN- ^1H de la fracción EO-218 A-II, (ver anexo, figura A-2) muestra una mayor diversidad de señales respecto a EO-218 A-I. Además de las señales características de cadenas alifáticas, entre δ_{H} 0.86 y 2.50, se pueden observar en esta región del espectro, una serie de señales que pueden corresponder a diferentes metabolitos de la ruta metabólica del mevalonato, por la secuencia de grupos metilo que presentan. La segunda región a destacar en el espectro, se encuentra entre δ_{H} 6.00 y 6.67, asociada a señales de protones olefínicos.

La mezcla de esta fracción, también se analizó por GC/MS. En el cromatograma (ver desarrollo experimental, 2.5.5.1) se pudieron detectar 14 picos mayoritarios (tabla 4).

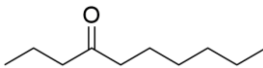
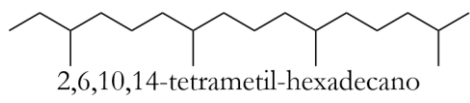
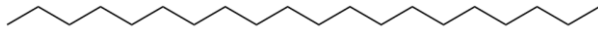
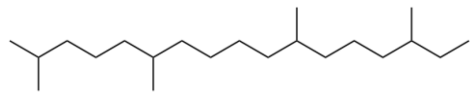
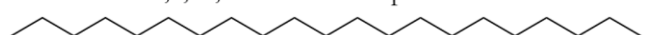
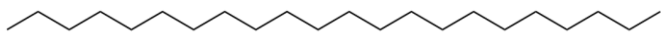
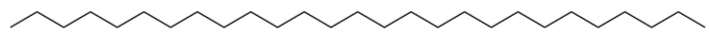
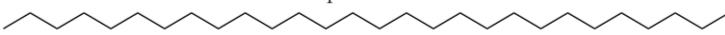
Tabla 4. Metabolitos identificados en la fracción EO-218 A-II.

| n° | t _R (min) | Estructura química | Fórmula molecular |
|----|-------------------------|---|---|
| 8 | 10.41 |  β -ionona | C ₁₃ H ₂₀ O |
| 9 | 11.44 |  β -ionona-epóxido | C ₁₃ H ₂₀ O ₂ |
| 10 | 11.55 |  3,7-dimetil-1-octanol | C ₁₀ H ₂₂ O |
| 11 | 11.72 |  fitol | C ₂₀ H ₄₀ O |
| 12 | 14.26 |  1-tiazol-2-il-1H-pirrol-2-carbaldehído | C ₈ H ₆ N ₂ OS |
| 13 | 17.11 |  3-oxo- β -ionone | C ₁₃ H ₁₈ O ₂ |

⁶⁸ Liu, A.; Zhu, T.; Lu, X.; Song, L. *Appl. Energy*. **2013**, *111*, 383-393.

⁶⁹ Bharat, N.; Irshad, M.; Rizvi, M. A.; Fatma, T. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* **2013**, *9*, 4328-4342.

⁷⁰ Gopinath, M.; Vijayakumar, L.; Dhanasekar, R.; Viruthagiri, T. *Global J. Biotech. & Biochem.* **2008**, *3*, 60-68.

| | | | |
|----|-------|--|-----------------|
| 14 | 33.48 |  | $C_{10}H_{20}O$ |
| 15 | 34.38 |  | $C_{20}H_{42}$ |
| 16 | 35.15 |  | $C_{20}H_{42}$ |
| 17 | 35.90 |  | $C_{21}H_{44}$ |
| 18 | 36.65 |  | $C_{21}H_{44}$ |
| 19 | 37.37 |  | $C_{22}H_{46}$ |
| 20 | 38.17 |  | $C_{27}H_{56}$ |
| 21 | 39.09 |  | $C_{28}H_{58}$ |

En el estudio de GC/MS se hallaron una serie de alcanos: eicosano (16), heneicosano (18), docosano (19), heptacosano (20) y octacosano (21) que, previamente, han sido identificados en *Arthrospira platensis*,⁶⁰ *A. maxima*,⁶⁰ *A. sphaerica*,⁷¹ *O. agardhii*,⁷¹ *O. limnetica*,⁷¹ *M. aeruginosa*,⁷² y *N. muscurum*.⁷³ En esta fracción también se encontró 4-decanona, la cual sólo ha sido encontrada en *A. platensis*.⁷⁴ También se confirmó la presencia de metabolitos secundarios procedentes de la ruta del ácido mevalónico: β -ionona (8), β -ionona-epóxido (9) y 3-oxo- β -ionona (13). Estos se han identificado en cianobacterias del género *Spirulina*,⁶⁵ *Anabaena*,⁶⁵ *Nostoc*,⁷⁵ *Oscillatoria*,^{75a} *Microcystis*,⁷⁶ y *Anacystis*.⁷⁷ Las β -iononas son compuestos volátiles de olor agradable que tienen una gran relevancia en la industria alimenticia como aditivos.⁷⁸ La biosíntesis de los derivados de β -ionona proviene de la ruptura de carotenoides mediante dioxigenasas.⁷⁹ El 3,7-dimetil octanol (10), $t_R = 11.5$ min., sólo ha sido hallado en *Synechocystis* sp.⁸⁰ con aplicación como biocombustible. El otro alcohol derivado de la ruta del mevalonato fue el fitol (11), $t_R = 11.72$ min, el resto de fitilo se encuentra presente en todas las cianobacterias y plantas.

⁷¹ Jamil, T. S.; Aty, A. M. A.; Ghafar, H. H.; Abdo, S. M. *Desalin. Water Treat.* **2014**, 2-8.

⁷² Wang, W.; Shen, H.; Shi, P.; Chen, J.; Ni, L.; Xie, P. *J. Appl. Phycol.* **2016**, 28, 1111-1123.

⁷³ Ananya, A.; Kamal, A. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, 8, 159-163.

⁷⁴ Agüero, J.; Lora, J.; Estrada, K.; Concepcion, F.; Nunez, A.; Rodriguez, A.; Pino, J. A. *J. Essent. Oil Res.* **2003**, 15, 114-117.

⁷⁵ a) Abdel-Hafez, S. I.; Abo-Elyousr, K. A.; Abdel-Rahim, I. R. *Eur. J. Phycol.* **2015**, 50, 239-245. b) Ninomiya, M.; Satoh, H.; Yamaguchi, Y.; Takenaka, H.; Koketsu, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, 75, 2175-2177.

⁷⁶ Shao, J.; Xu, Y.; Wang, Z.; Jiang, Y.; Yu, G.; Peng, X.; Li, R. *Aquat. Toxicol.* **2011**, 104, 48-55.

⁷⁷ Henatsch, J. J.; Jüttner, F. *Wat. Sci. Tech.* **1983**, 15, 259-266.

⁷⁸ Jüttner, F. (1987) In *The Cyanobacteria, Volatile organic substances*, Fay P., Van Baalen C (eds). Elsevier Science: Amsterdam, pp. 453-469.

⁷⁹ Simkin, A. J.; Schwartz, S. H.; Auldrige, M.; Taylor, M. G.; Klee, H. J. *Plant J.* **2004**, 40, 882-892.

⁸⁰ Hellier, P.; Al-Haj, L.; Talibi, M.; Purton, S.; Ladommatos, N. *Fuel.* **2013**, 11, 670-688.

Es utilizado para la formación de tocoferoles y sirve como sustrato para la formación de clorofilas, ubiquinonas, plastoquinonas y filoquinonas.⁸¹

También se identificó 1-tiazol-2il-1H-pirrol-2-carbaldehído (**12**); únicamente ha sido encontrado en *Nostoc muscorum*.⁸²

El análisis de la fracción EO-218-A evidencia lo comentado previamente en la introducción, los tilacoides de las membranas intracelulares contienen compuestos hidrocarbonados de cadena larga, contribuyendo los mismos a incrementar la fluidez de las membranas, el crecimiento y la actividad fotosintética a bajas temperaturas, e interés industrial como biocombustibles industriales.²¹

2.3.4 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN EO-218 B

La fracción B exhibió actividad regenerativa moderada, por lo que se decidió estudiarla. La fracción EO-218 B se sometió a una purificación por cromatografía en columna sobre sílica, utilizando como eluyente la mezcla heptano-AcOEt (5:1). Se obtuvieron 6 subfracciones (I-VI), de las que únicamente II y IV mostraron actividad antioxidante y antiinflamatoria (ver desarrollo experimental, 2.5.4.3).

2.3.4.1 Determinación estructural de EO-218 B-II (**22**)

El compuesto **22** es uno de los componentes mayoritarios de la cepa *Dolichospermum* sp. aislándose en un 4%, respecto a biomasa seca.

El espectro de masas de alta resolución (ver anexo, figura A-6) mostró los iones $[M+H]^+$ m/z 871.5729 y $[M+Na]^+$ m/z 893.5642 correspondiente a la fórmula molecular $C_{55}H_{74}N_4O_5$ y acorde a un grado de insaturación de 21.

El espectro de RMN- H^1 (figura 7) muestra tres señales singlete a δ_H 8.56, 9.20 y 9.38, integrando cada señal por un protón, por lo que, en principio, parece tratarse de protones aromáticos o heterocíclicos. Igualmente, aparece un sistema ABX correspondiente a un resto vinílico: δ_{HX} 7.87 (dd, 1H, J_{AX} = 17.7, J_{BX} = 11.6 Hz), δ_{HA} 6.21 (dd, 1H, J_{AX} = 17.7, J_{AB} = 1.2 Hz) y δ_{HB} 6.12 (dd, 1H, J_{BX} = 11.6, J_{AB} = 1.2 Hz).

⁸¹ a) Pattanaik, B.; Lindberg, P. *Life*. **2015**, 5, 269-293. b) Proteau, P. J. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 841-843.

⁸² Adway, A. A.; Ibrahim, W. M.; Karam, M. A.; Karam, M. A. *Int. J. Curr. Sci. Res.* **2017**, 3, 1156-1174.

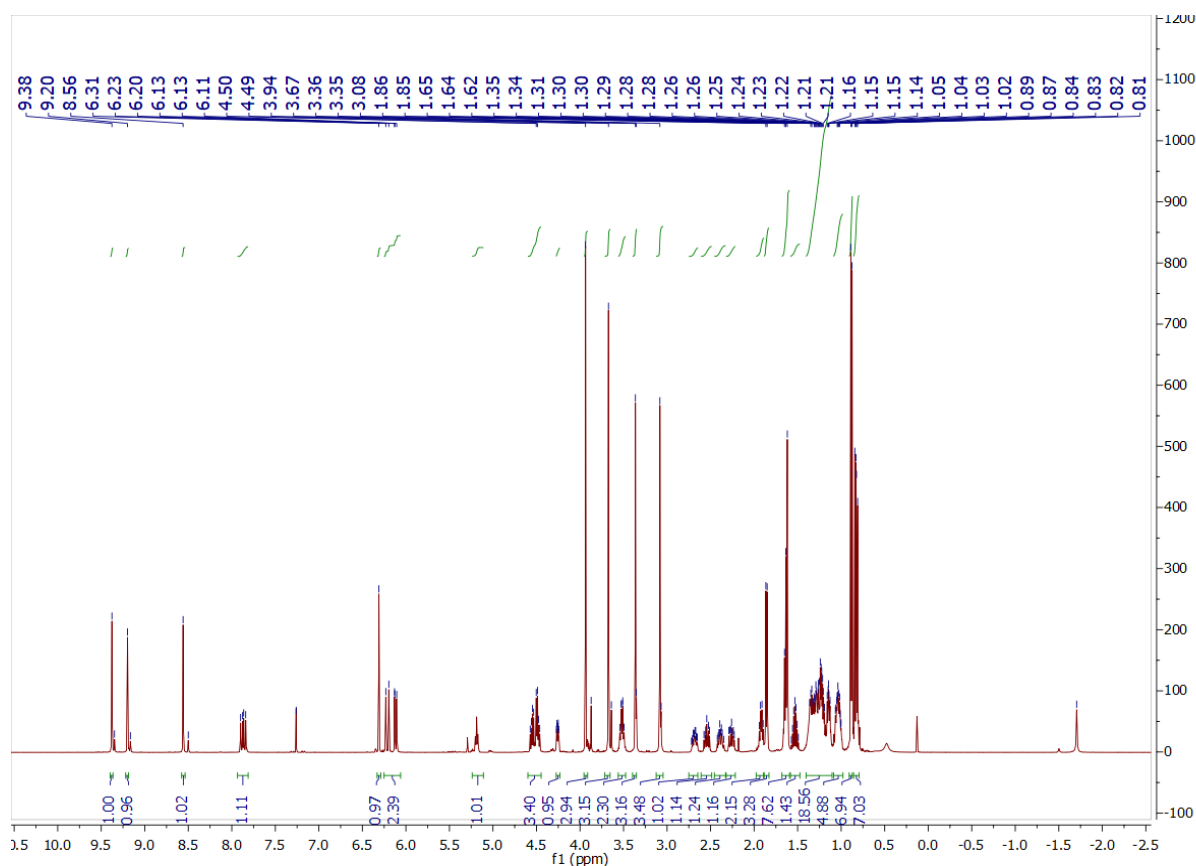


Figura 7. Espectro RMN- H^1 del compuesto **22**.

Adicionalmente, en el espectro aparecen tres singletes correspondientes a tres metilos unidos a un C_{sp^2} a δ_H 3.08 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.67 (s, 3H) y un grupo metoxilo a δ_H 3.88 (s, 3H). En esta región, se observa también la presencia de dos multipletes a δ_H 4.47-4.58 (m, 3H) y 4.24-4.28 (m, 1H). En la región que comprende δ_H 2.20-2.75 resuenan cuatro protones diastereotópicos de multiplicidad compleja. En la parte alta del espectro (menor desplazamiento químico) aparecen dos dobletes, correspondientes a tres metilos δ_H 1.86 (d, 3H, $J=7.3$ Hz) y 0.88 (d, 6H, $J=6.6$ Hz). Los dos metilos a δ_H 0.88 son característicos de un resto isopropilo terminal de cadena alifática, que presentan acoplamiento con el CH a δ_H 1.53 (sept, 1H, $J=6.6$ Hz). En la región entre δ_H 1.0-1.4 (m, 24H) se detecta una gran congestión de señales alifáticas que se corresponden a CH_2 alifáticos de cadena alquílica. La congestión de señales, junto a la presencia de un gran número de metilos sobre C_{sp^2} , evidencia que, al menos, un fragmento proviene de la ruta del mevalonato. Finalmente, destaca, de manera muy especial, la señal singlete a campo negativo δ_H -1.71 (s, 1H), ya que existen pocas moléculas orgánicas con este tipo de señales y es característica de NH porfirínicos.

La fuerte coloración verde de la muestra, su fórmula molecular, el grado de insaturación, el análisis espectroscópico de RMN (H^1 y C^{13}) y la gran cantidad aislada, nos llevó a revisar los metabolitos mayoritarios de las cianobacterias. Entre las diferentes familias, las feofitinas son las que se ajustaban a los datos obtenidos. Para corroborar esta hipótesis, se realizó un estudio comparativo entre los datos experimentales del compuesto

22 (tabla 4) y los bibliográficos.⁸³ Las feofitinas son el producto de las clorofilas que han perdido el magnesio quelatante. El análisis comparativo dio como resultado que la feofitina que más se adecuaba, era la feofitina A.

Tabla 4. Datos de RMN experimentales y bibliográficos correspondientes a 22.

| Posición | δ_C literatura, ppm | δ^1H literatura, ppm (J_{HH} Hz) | δ_C , ppm | δ^1H , ppm (J_{HH} Hz) |
|----------|----------------------------|--|------------------|----------------------------------|
| 1 | 132.1 | - | 131.9 | - |
| 2 | 136.4 | - | 136.3 | - |
| 3 | 136.0 | - | 136.2 | - |
| 4 | 145.2 | - | 145.2 | - |
| 5 | 128.9 | - | 129.0 | - |
| 6 | 130.1 | - | 129.1 | - |
| 7 | 52.1 | 4.21 | 51.3 | 4.25 |
| 8 | 50.8 | 4.46 | 50.3 | 4.47 |
| 9 | 189.2 | - | 189.8 | - |
| 10 | 66.4 | 6.26 | 64.9 | 6.31 |
| 11 | 142.2 | - | 142.2 | - |
| 12 | 136.5 | - | 136.5 | - |
| 13 | 155.6 | - | 155.8 | - |
| 14 | 151.4 | - | 151.0 | - |
| 15 | 138.5 | - | 138.0 | - |
| 16 | 149.9 | - | 149.8 | - |
| 17 | 162.1 | - | 161.4 | - |
| 18 | 172.2 | - | 172.3 | - |
| α | 97.5 | 9.38 | 97.5 | 9.20 |
| β | 104.4 | 9.52 | 104.4 | 9.38 |
| γ | 106.8 | 8.55 | 106.8 | 8.56 |
| δ | 93.9 | - | 93.2 | - |
| 1a | 11.9 | 3.40 | 12.2 | 3.36 |
| 2a | 129.7 | 8.00 | 129.1 | 7.87 |
| 2b | 122.1 | 6.27 | 122.8 | 6.22 |
| | | 6.18 | | 6.12 |
| 3a | 10.8 | 3.23 | 11.3 | 3.08 |
| 4a | 19.5 | 3.68 | 19.4 | 3.52 |
| 4b | 17.4 | 1.69 | 17.5 | 1.64 |
| 5a | 11.7 | 3.68 | 12.2 | 3.67 |
| 7a | 31.7 | 2.63 | 31.4 | 2.68 |
| | | 2.34 | | 2.39 |
| 7b | 30.2 | 2.49 | 30.0 | 2.54 |
| | | 2.19 | | 2.26 |
| 7c | 172.9 | - | 173.0 | - |
| 8a | 23.3 | 1.80 | 23.3 | 1.86 |
| 10a | 169.6 | - | 169.8 | - |
| 10b | 52.9 | 3.88 | 53.0 | 3.88 |
| P1 | 61.4 | 4.50 | 61.6 | 4.48 |
| | | 4.43 | | 4.56 |

⁸³ a) Smith, K. M.; Goff, D. A.; Abraham, R. J. *Org. Magnet. Res.* **1984**, 22, 779-783. b) Lötjönen, S.; Hynninen, P. H. *Org. Magnet. Res.* **1983**, 21, 757-765.

| | | | | |
|-------------|-------|------|-------|-------|
| P2 | 119.5 | 5.13 | 117.9 | 5.19 |
| P3 | 142.2 | - | 142.2 | - |
| P3a | 16.4 | 1.56 | 16.4 | 1.62 |
| P7a | 22.7 | 0.85 | 22.7 | 0.88 |
| P11a | 22.7 | 0.85 | 22.7 | 0.88 |
| P15a | 19.7 | 0.80 | 19.7 | 0.84 |
| P16 | 19.7 | 0.78 | 19.7 | 0.82 |
| NH | - | - | - | -1.72 |

Si se comparan los datos del compuesto **22** con la feofitina A, existen pequeñas variaciones en el desplazamiento químico, especialmente, en el espectro de RMN- ^1H . Este hecho es justificable en base a que las feofitinas, al no presentar el magnesio quelatado, tienen espectros de RMN- ^1H que dependen fuertemente de la concentración. Al incrementarse la concentración se amplifican las interacciones de tipo π - π entre los anillos porfirínicos, lo cual genera modificaciones de los desplazamientos químicos, que se ven especialmente acentuados en los espectros de RMN- ^1H .⁸⁴

Por tanto, se puede concluir que la molécula **22** es la feofitina A.

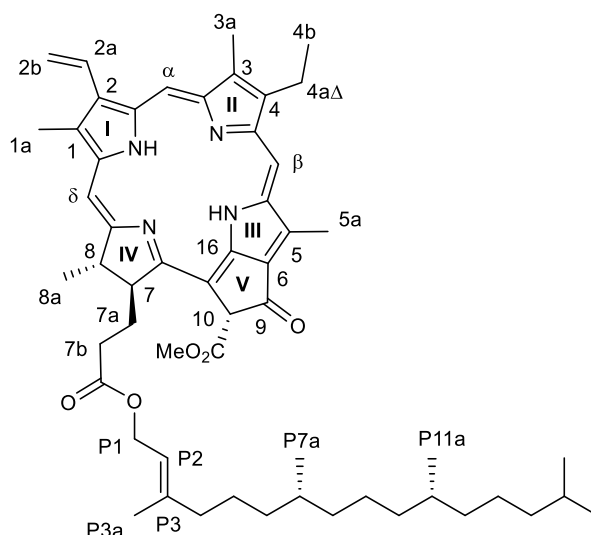


Figura 8. Estructura química de feofitina A (**22**).

2.3.4.2 Determinación estructural de EO-218 B-IV (**23**)

El compuesto EO-218-B-IV (**23**) muestra en el espectro HRESIMS (ver anexo, figura A-10) dos iones a $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 887.5695 y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 909.5529, correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_6$.

Los espectros de RMN (ver anexo, figuras A-7 y A-8) mostraron un perfil muy similar al de la feofitina A (**22**), por lo que pensamos que, también, estaba relacionado con la feofitina A; la única diferencia en su fórmula molecular, es la presencia de un átomo adicional de oxígeno. En el espectro de RMN- ^1H el cambio más significativo es la

⁸⁴ Smith, K. M.; Goff, D. A.; Abraham, R. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1988**, *1*, 2443-2448.

desaparición de la señal singlete a δ_H 6.31, correspondiente a la posición H-10 de la feofitina A y en el espectro de RMN- C^{13} no se observa el CH correspondiente a C-10 sino que, en su lugar, aparece una señal a δ_C 89.4, característica de un carbono cuaternario con un grupo hidroxilo. La presencia del grupo hidroxilo justificaría el desapantallamiento de la cetona α,β -insaturada, δ_C 192.1, debido a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. Los datos de RMN han sido confirmados con la bibliografía y el metabolito que mejor se adecúa, es la 13^2 -hidroxi-feofitina A (figura 9).⁸⁵

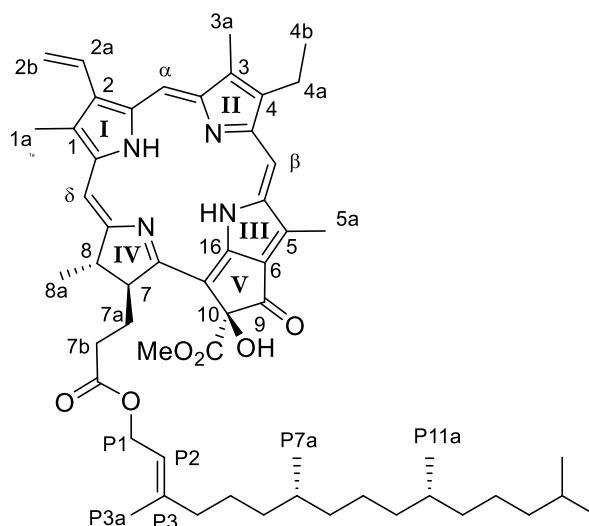


Figura 9. Estructura química de 13^2 -hidroxi-feofitina A (23).

La 13^2 -hidroxi-feofitina A es un artefacto producido a partir de feofitina A por autooxidación o alomerización, siendo un producto de degradación de la misma.⁸⁶

Las clorofilas se encuentran en las membranas de los tilacoides, en las que están asociadas con proteínas y otros pigmentos, dando lugar a los fotosistemas. La unión con las membranas de los tilacoides se realizan a través del resto fitol. La clorofila A es esencial para la mayoría de organismos fotosintéticos en la obtención de energía química en el proceso de la fotosíntesis. La absorción de la clorofila A se produce en la región del espectro UV que va del violeta al rojo; si bien, su emisión se produce, principalmente, en la región del verde y por eso ofrecen una coloración tan característica.⁸⁷

2.3.4.3 Actividad biológica “in vitro”.

Las dos moléculas fueron probadas como promotores de la regeneración celular sobre células HaCat, (figura 10).

⁸⁵ Jerz, G.; Arrey, T. N.; Wray, V.; Du, Q.; Winterhalter, P. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2007**, 8, 413-418.

⁸⁶ a) Sakdarat, S.; Shuypron, A.; Ayudhya, T. D.; Waterman, P. G.; Karagianis, G. *Thai J. Phytop.* **2008**, 40, 13. b) Dissanayake, P. K.; Yamauchi, N.; Shigyo, M. *J. Agric. Sci.* **2012**, 7, 127.

⁸⁷ Hosikian, A.; Lim, S.; Halim, R.; Danquah, M. K. *Int. J. Chem. Eng.* **2010**, 1-11.

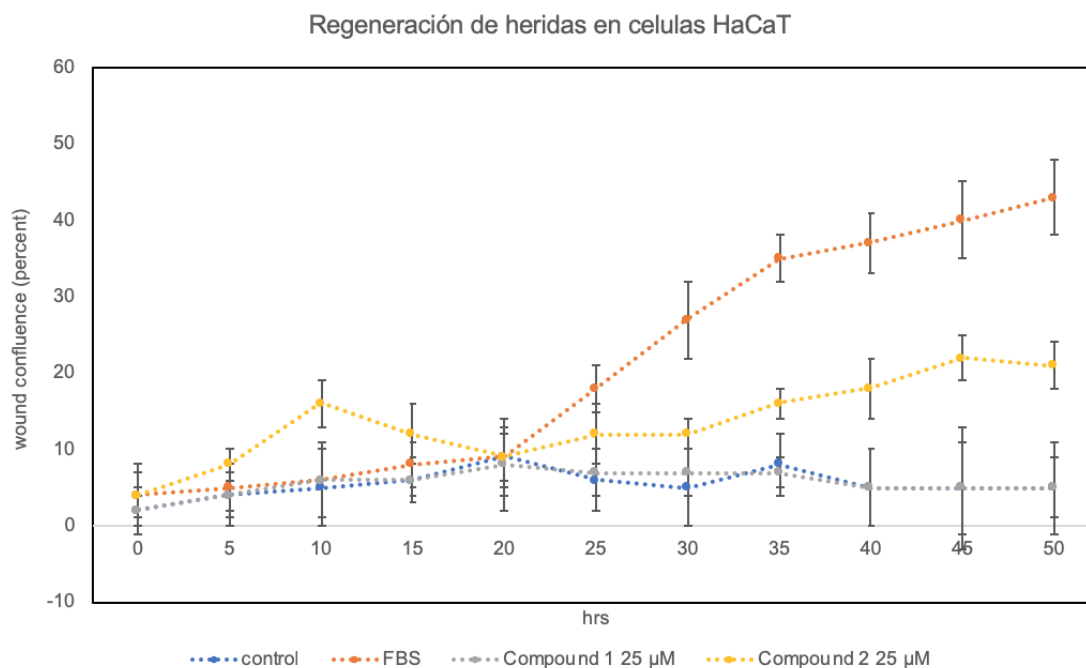


Figura 10. Actividad regenerativa celular de las moléculas **22** y **23**.

Los compuestos fueron disueltos en DMSO, que fue utilizado como control negativo. Como control positivo se utilizó suero bovino fetal, el cual es empleado en terapias de regeneración celular y crecimiento epitelial.⁸⁸ Los datos obtenidos mostraban que la feofitina A (**22**) no promovía la regeneración celular, y la 3²-hidroxi-feofitina A (**23**) generada como artefacto de la misma sí producía una ligera regeneración celular a partir de las 20 horas. Estos datos revelan que la hidroxilación en la posición 10, y por tanto el aumento de polaridad, es imprescindible para promover la actividad regenerativa.

Esto se corroboró con las investigaciones previas realizadas con clorofilinas, derivados semisintéticos de clorofilas en los que los grupos éster han sido hidrolizados a sus correspondientes carboxilatos y se encuentran en forma de sal (figura 11). Este tipo de moléculas han sido utilizadas en terapias de regeneración celular desde los años 50.⁸⁹

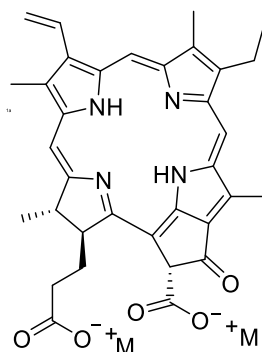


Figura 11. Estructura química general de las clorofilinas.

⁸⁸ Wu, M. F.; Stacho, T.; Seitz, B.; Langenbucher, A.; Szentmáry, N. *Int. J. Ophthalmol.* **2017**, *10*, 908-913.

⁸⁹ a) Bowers, W. F. *Am. J. Sur.* **1947**, *7*, 37-50. b) Smith, R. G. *Wounds*. **2008**, *54*, 16-34.

La regeneración celular representa un reto mundial para la salud, en el que se invierten mucho esfuerzo científico, económico y social para mejorar la salud de las personas.⁹⁰ Este proceso es especialmente importante en los pacientes con diabetes, en los que el mecanismo de regeneración celular está desregulado. Este estado genera que dichos pacientes sean más susceptibles de sufrir infecciones y episodios de inflamación aguda, por lo que es necesario el descubrimiento de agentes de cicatrización rápida.⁹¹

2.3.5 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN EO-218 C

La fracción C exhibió una alta actividad antifúngica, anti VIH, antitumoral, antioxidante y antiinflamatoria. Se considera que en esta fracción debe estar el principio más activo del extracto EO-218. Por este motivo, se realizó aislamiento, purificación e identificación estructural del mismo.

La fracción EO-218-C se purificó por cromatografía en columna con sílica, utilizando el eluyente heptano-AcOEt (1:1), aislándose 5 subfracciones (I-V). Únicamente, EO-218-C-III presentó una potente actividad en todas las líneas biológicas probadas; por lo que se procedió a su catacterización estructural.

2.3.5.1 Determinación estructural de EO-218 C-III (**24**).

El espectro de HRESIMS (ver anexo, figura A-17) muestra un pico $[M+H]^+$ m/z 299.2346 y $[M+Na]^+$ m/z 321.2152, de acuerdo con la fórmula molecular $C_{16}H_{30}N_2O_3$, lo que implica tres grados de insaturación.

El espectro de RMN- 1H (figura 12) revela dos señales correspondientes a metilos, δ_H 0.89 (t, 3H, J= 6.8 Hz) y 0.90 (t, 3H, J= 6.8 Hz), que son características de metilos terminales de cadena alifática. Entre δ_H 1.29-1.35 aparece una gran congestión de señales alifáticas. A δ_H 1.40-1.75 se pueden observar, también, seis protones alifáticos. Si bien, puede visualizarse una multiplicidad compleja, atribuible a la cercanía de un centro quiral, esto parece indicar, que el compuesto **24** tiene dos cadenas alquílicas terminales.

⁹⁰ Benbow, M. J. *Community Nurs.* **2011**, 25, 18-23.

⁹¹ Gabriele, S.; Buchanan, B.; Kundu, A.; Dwyer, H. C.; Gabriele, J. P.; Mayer, P.; Baranowski, D. C. *Wounds.* **2019**, 31, 49-54.

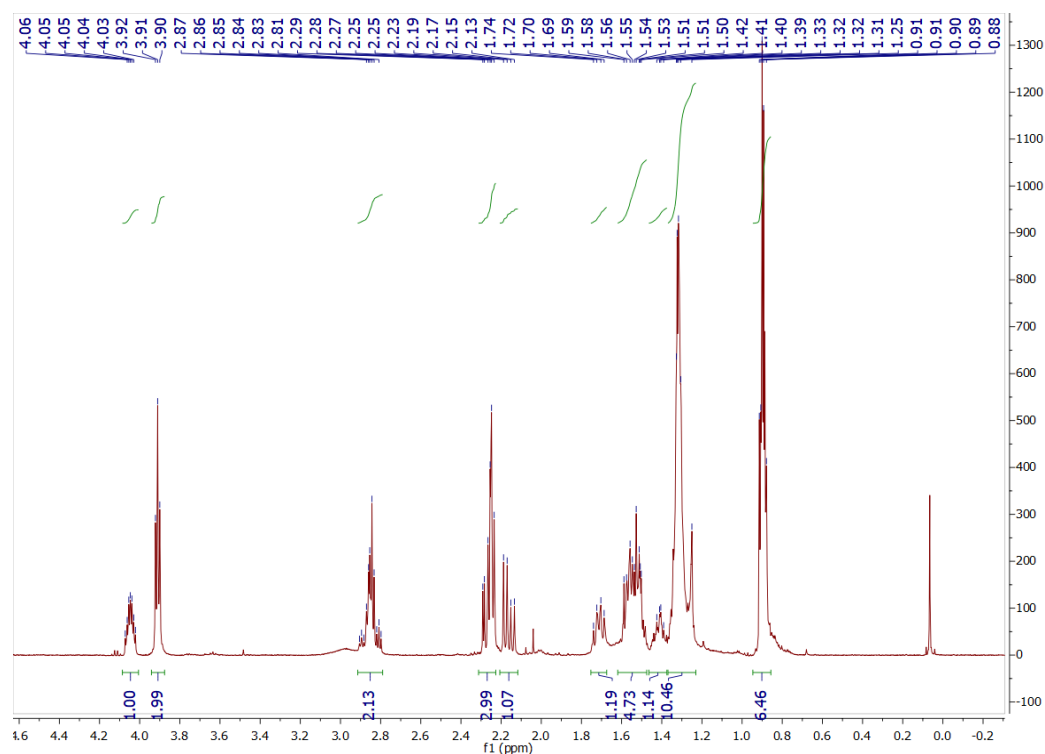


Figura 12. Espectro RMN- H^1 de EO-218 C-III.

En la región del espectro entre δ_H 2.15-2.29 (figura 13) se observan 3 grupos de señales: dos correspondientes a un sistema ABX, δ_{HA} 2.30 (dd, 1H, J_{AX} = 8.8, J_{AB} = 18.1 Hz) y δ_{HB} 2.21 (dd, 1H, J_{BX} = 3.8, J_{AB} = 18.1 Hz), y otra señal correspondiente a un triplete δ_H 2.3 (t, 2H, J = 6.6 Hz). A δ_H 2.89 aparece una señal multiplete, y a δ_H 3.01 una señal ancha, assignable a un protón de tipo OH o NH. Los desplazamientos de las dos señales a δ_H 3.91 (t, 2H, J = 5.2 Hz) y 4.04 (dddd, 1H, J = 3.8, 4.9, 7.8, 8.8 Hz), se corresponden con hidrógenos unidos a átomos de oxígeno.

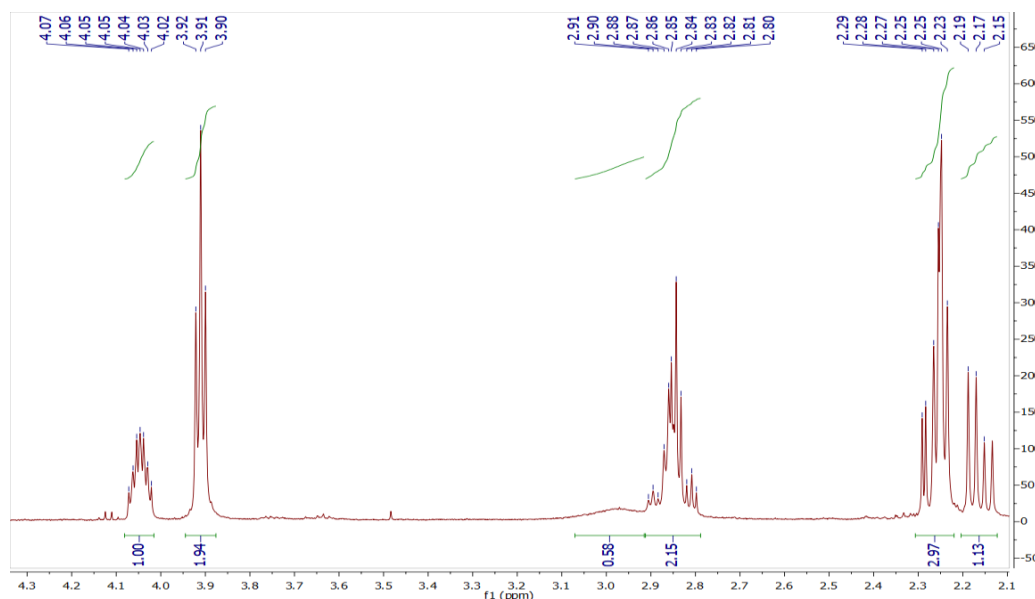


Figura 13. Ampliación del espectro RMN- H^1 de EO-218 C-III.

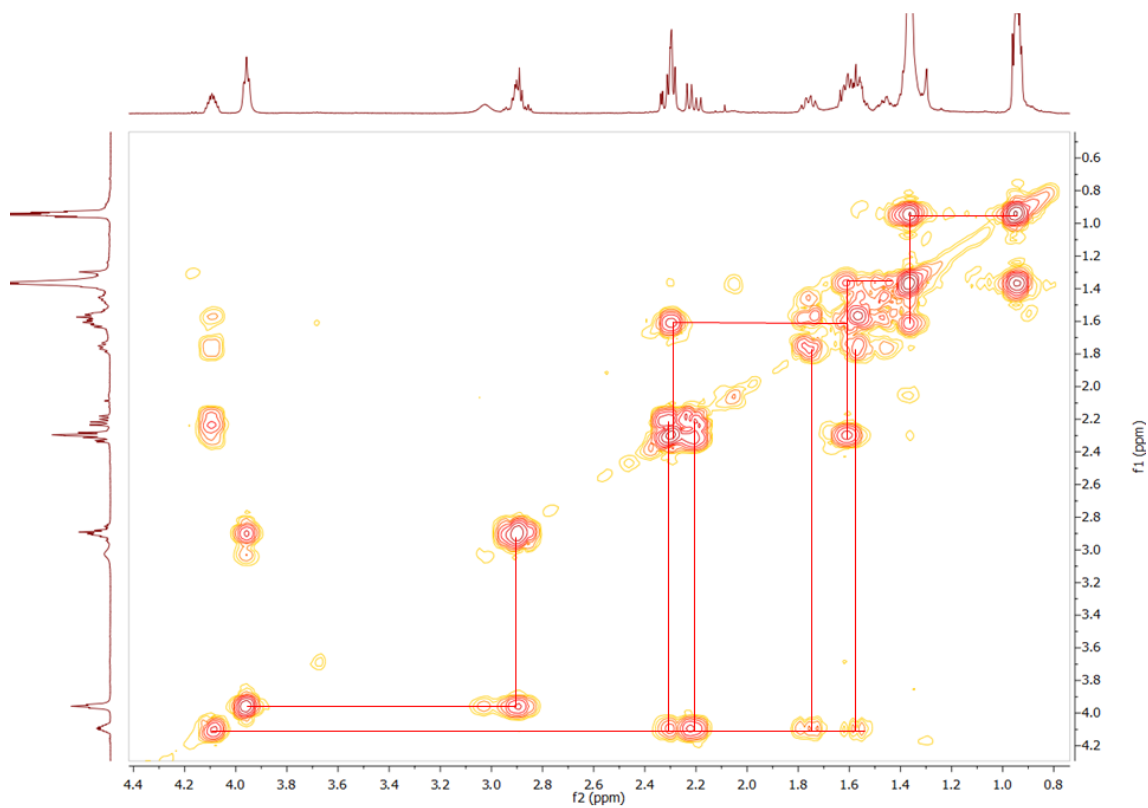


Figura 14. Espectro COSY de 24.

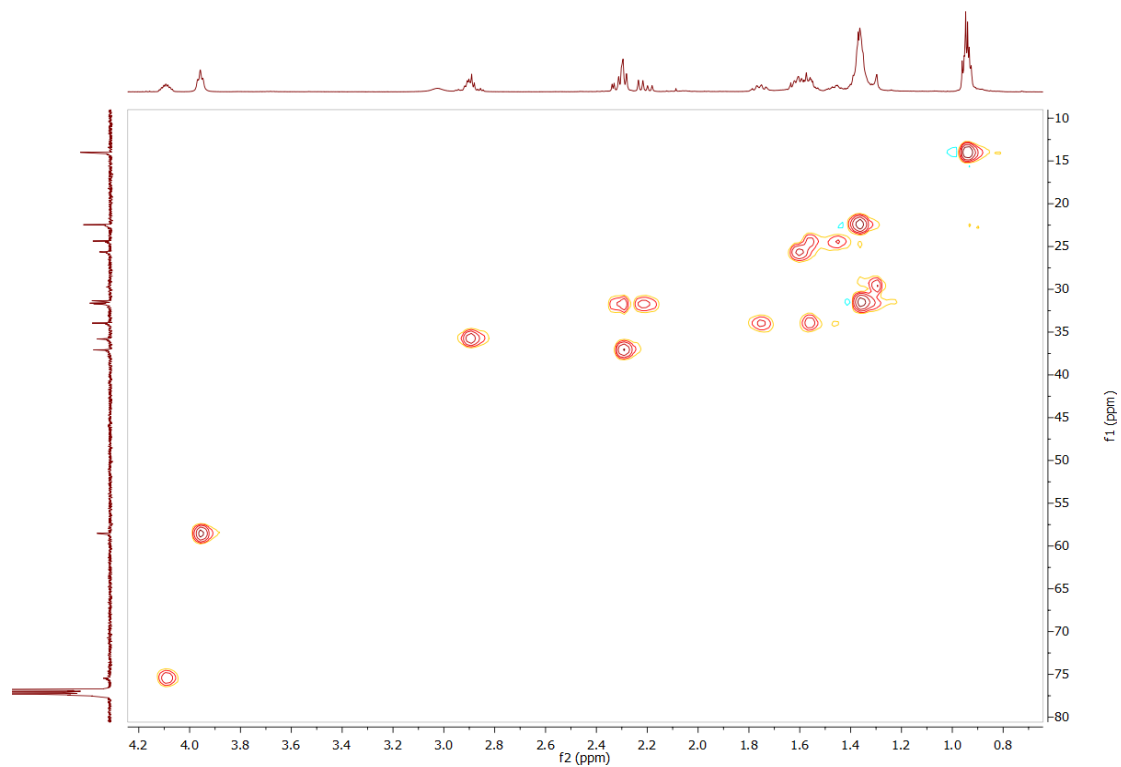


Figura 15. Espectro HSQC de 24.

La combinación de los espectros COSY y HSQC (figuras 14 y 15) confirmaron la presencia de tres sistemas de spin: una cadena alifática que contenía un átomo de oxígeno (figura 16a), otra cadena alifática sin funcionalización aparente (figura 16b) y un resto C_2 en el cual, uno de los carbonos, está unido a un átomo de oxígeno (figura 16c).

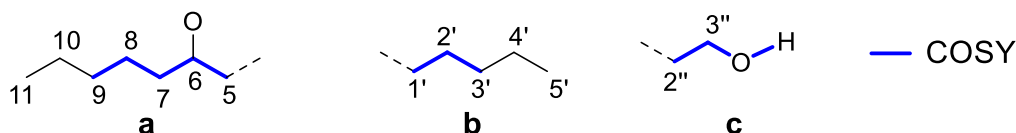


Figura 16. *Sistemas de spin a, b y c para 24.*

En el sistema **a**, el protón a δ_H 4.05 (H-6) y δ_C 75.58 (C-6) muestra acoplamiento COSY con los dobles dobles a δ_H 2.21 y 2.30 (H-5a y H-5b), así como, los multipletes a δ_H 1.51 y 1.71 (H-7a y H-7b). Estos protones tienen correlación a $^1J_{CH}$ (HMQC) con los carbonos a δ_C 31.7 (C-5) y 34.1 (C-7), respectivamente. Las señales de H-7 poseen acoplamiento COSY con δ_H 1.40 (H-8), el cual tiene correlación HSQC ($^1J_{CH}$) con δ_C 24.5 (C-8). Los protones del metileno CH_2 -8 están acoplados mediante COSY con δ_H 1.32 (H-9), que posee correlación $^1J_{CH}$ con δ_C 31.7 (C-9). Este metileno se correlaciona con uno de los CH_2 unido a uno de los metilos terminales; sin embargo, no fue posible determinar, mediante el espectro COSY, con cuál de ellos se correspondía.

El sistema **b** se caracteriza por tener un grupo metileno δ_H 2.30 (H-1'), que exhibe acoplamiento con una señal multiplete correspondiente con un grupo CH_2 a δ_H 1.56 (H-2'); ambos metilenos presentan correlación a $^1J_{CH}$ con los carbonos δ_C 37.5 (C-1') y δ_C 25.7 (C-2'), respectivamente. El protón H-2' se encuentra acoplado, según el espectro COSY, con el metileno que resuena a δ_H 1.32 (H-3'), el cual tiene correlación $^1J_{CH}$ con el carbono a δ_C 22.6 (C-3'). A su vez, los protones del metileno CH_2 -3' muestran acoplamiento con uno de los CH_2 unidos a un metilo terminal, pero debido a la congestión de señales no fue posible diferenciarlo, mediante COSY, con el correspondiente metileno del sistema de spin **a**.

El sistema de spin **c** está formado por un triplete a δ_H 3.91 (H-3''), que presentó acoplamiento con el multiplete δ_H 2.83 (H-2'') y la señal ancha correspondiente al protón intercambiable a δ_H 2.98; por lo que la señal ancha a 2.98 ppm, la asignamos a un OH (H-3''OH). A su vez, el protón H-3'' posee correlación $^1J_{CH}$ con el carbono a δ_C 58.63, característico de una unión CH_2OH . Finalmente, el protón H-2'' tenía acoplamiento $^1J_{CH}$ con el carbono a δ_C 36.1.

Una vez asignada la correlación entre los protones unidos a carbonos a través de HSQC, quedan sin asignar dos átomos de carbono cuaternarios. En el espectro de RMN- C^{13} (ver anexo, figura A-12) sólo resuenan un total de quince carbonos, lo que nos llevó a considerar que uno de los átomos de carbono no relaja bien, o que ambos carbonos cuaternarios estaban solapados. Para resolver esto, así como para completar la estructura plana de la molécula, fue imprescindible el espectro de HMBC (figura 17).

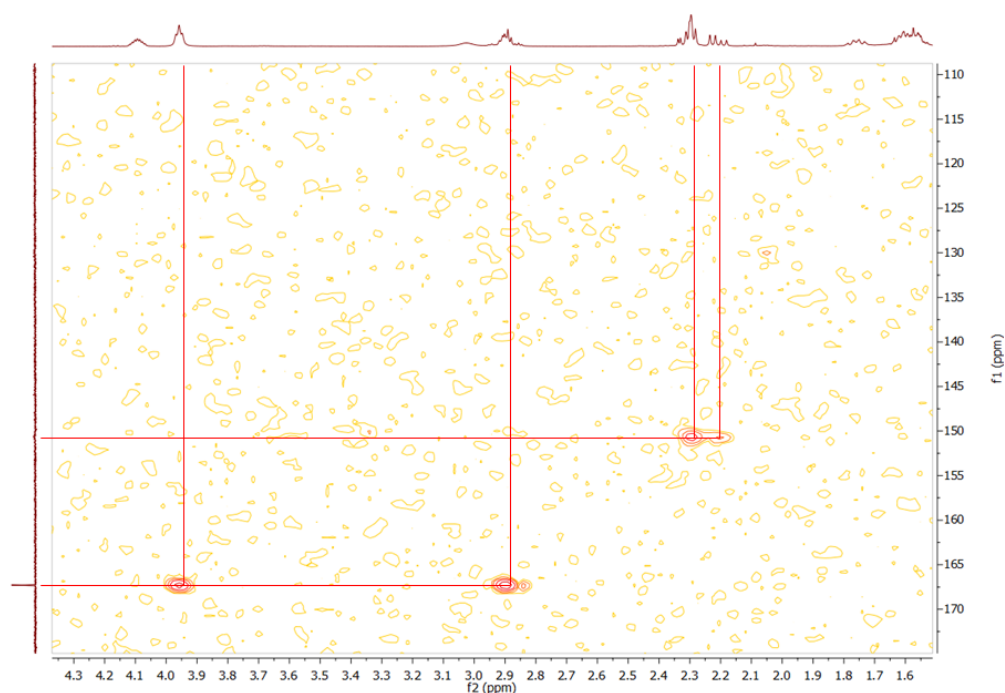


Figura 17. Espectro HMBC de 24.

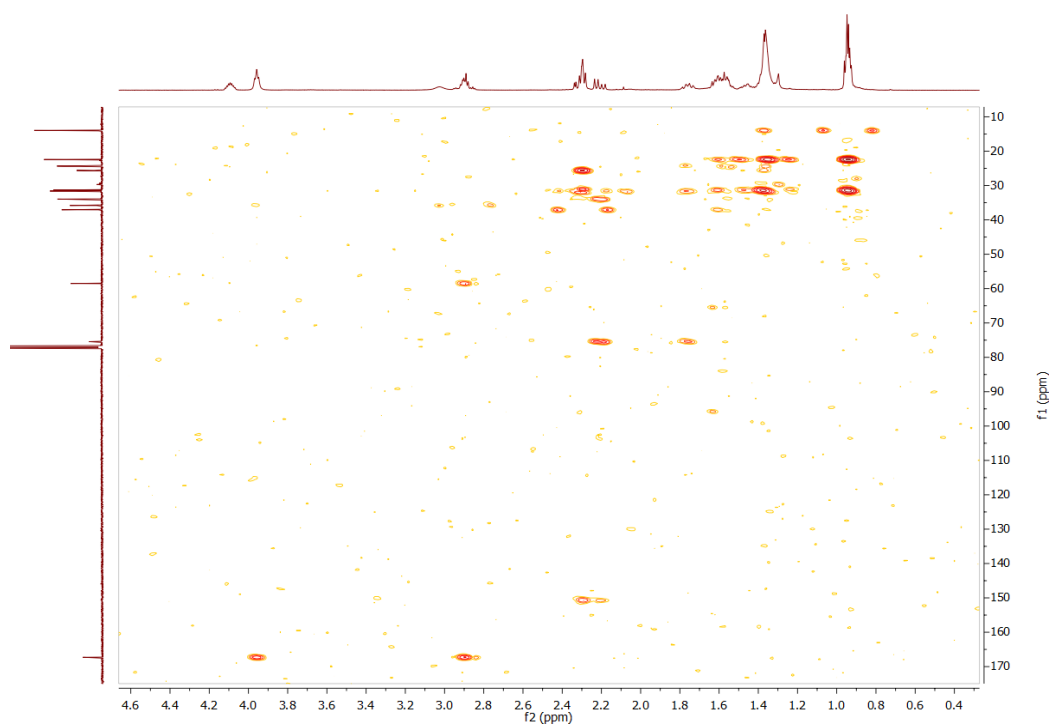


Figura 18. Ampliación del espectro HMBC de 24.

El espectro bidimensional HMBC (figuras 17 y 18) determinó la presencia del segundo carbono cuaternario a δ_C 150.72 (C-4), que no se detecta por RMN- C^{13} y presenta correlación HMBC $^{2,3}J_{CH}$ con H-1' y H-5; estos datos nos permiten enlazar los sistemas de

spin **a** y **b**. Su desplazamiento químico es característico de carbonos con hibridación sp^2 unido a nitrógeno, tipo imina o hidrazona. El segundo carbono cuaternario a δ_C 167.1 (C-1'') mostró acoplamiento $^{2,3}J_{CH}$ con H-2'' y H-3'', por lo que se corresponde con el sistema de spin **c**; su desplazamiento es característico de enlaces tipo amida, ya que los ésteres suelen aparecer a un campo más bajo. A través del espectro de HMBC, se ha conseguido realizar la asignación inequívoca de los metilos terminales y los grupos metileno que no habían podido ser asignados mediante el espectro COSY. Con los datos obtenidos hasta este punto, se tienen asignados los fragmentos que se muestran en la figura 19.

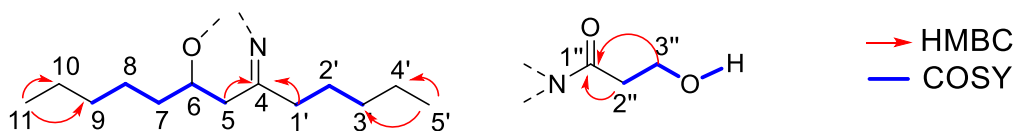


Figura 19. Fragmentos elucidados del análisis espectroscópico.

La fórmula molecular está en consonancia con tres átomos de nitrógeno y un grado de insaturación tres, además de 30 hidrógenos, los cuales ya están completamente asignados en la molécula. La única estructura que se adecua a todos los datos espectroscópicos y la fórmula molecular, es la reseñada en la figura 20.

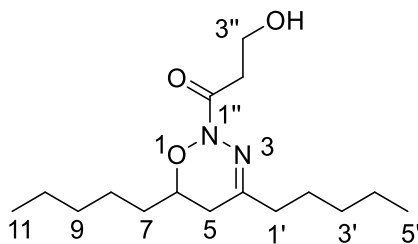


Figura 20. Estructura de 1-(4,6-dipentil-5,6-dihidro-2H-1,2,3-oxadiazin-2-il)-3-hidroxipropan-1-ona (24).

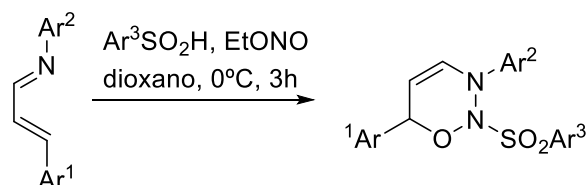
Los datos de RMN, la asignación de todas las señales, así como, las correlaciones más relevantes, se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Datos experimentales de RMN para el compuesto **24**.

| No. | δ_C , tipo | δ_H (J en Hz) | HMBC | COSY |
|-----|-----------------------|---|----------------|----------|
| 4 | 150.7 | | | |
| 5 | 31.7, CH ₂ | 2.30,dd, (8.8, 18.1) 2.21, dd, (3.8, 18.1) | 4,6,7 4,6,7 | 6 6 |
| 6 | 75.6, CH | 4.05,dddd, (3.8, 4.9, 7.8, 8.8) | - | 5,7 |
| 7 | 34.1, CH ₂ | 1.71, m 1.51, m | - - | 6,8 - |
| 8 | 24.5, CH ₂ | 1.40, m | - | 9, 7 |
| 9 | 31.7, CH ₂ | 1.32, m | - | 8 |
| 10 | 22.6, CH ₂ | 1.32, m | 11 | - |
| 11 | 14.1, CH ₃ | 0.89, t (6.8) | 10, 9 | 10 |
| 1' | 37.5 CH ₂ | 2.3, t (6.6) | 4, 2' | 2' |
| 2' | 25.7 CH ₂ | 1.56, m | - | 1', 3' |

| | | | | |
|---------------|-----------------------|---------------|----------|-------------|
| 3' | 31.5, CH ₂ | 1.32, m | | 2' |
| 4' | 22.5, CH ₂ | 1.32, m | 5' | |
| 5' | 14.1, CH ₃ | 0.90, t (6.8) | 3', 4' | 4' |
| 1'' | 167.1 | - | | - |
| 2'' | 36.1, CH ₂ | 2.83, m | 1'', 3'' | 3'' |
| 3'' | 58.6, CH ₂ | 3.91, t (5.2) | 1'', 2'' | 3''-OH, 2'' |
| 3''-OH | - | 2.98, bs | | |

A pesar de la gran variedad de heterociclos existentes en la naturaleza, las 1,2,3-oxadiazinas no han sido previamente descritas y apenas existe información físico-química de derivados sintéticos. El único método reseñado para la preparación de 1,2,3-oxadiazinas con rendimientos moderados ha sido llevada a cabo mediante una reacción de cicloadición [4+2] regioespecífica de 1,4-diaril-1-aza-1,3-butadienos con arenosulfonil nitrositos (esquema 1).⁹²



Esquema 1. Procedimiento químico para la síntesis de 1,2,3-oxadiazinas.

Otros isómeros de oxadiazinas (1,2,4 y 1,2,5) sí están presentes en la naturaleza y han sido sintetizados.⁹³ Son conocidos los ejemplos de dihidro oxadiazinas para desarrollar sustancias con actividades biológicas tan diversas como: tratamiento de enfermedades cardiovasculares, antitumorales o antimicrobianas;⁹⁴ actividades que estarían en consonancia con los datos experimentales obtenidos.

2.3.5.2 Estudio de la estereoquímica en C-6.

La dihidro-2*H*-1,2,3-oxadiazina aislada tenía un único estereocentro en C-6 y un poder rotatorio óptico específico de -75°; sin embargo, por RMN no se puede asignar la configuración del centro estereogénico C-6. Para determinar su configuración absoluta, la primera técnica que se valoró fue el dicroísmo circular vibracional. Esta técnica requiere comparar el espectro de dicroísmo circular experimental con un espectro simulado mediante ordenador. La presencia de las dos cadenas alifáticas de los sistemas de spin **a** y **b**, generan 780.000 conformeros diferentes, haciendo inviable el uso de esta técnica.

⁹² Singal, K. K.; Singh, B.; Raj, B. *Synth. Commun.* **1993**, 23, 107.

⁹³ a) Ke, S.; Cao, X.; Liang, Y.; Wang, K.; Yang, Z. *Mini Rev. Med. Chem.* **2011**, 11, 642-657. b) Bergmann, T.; Schories, D.; Steffan, B. *Tetrahedron.* **1997**, 53, 2055-2060.

⁹⁴ a) Tka, N.; Jegham, N.; Hassine, B. B. *R. Chim.* **2010**, 13, 1278-1283. b) Romine, J. L.; Martin, S. W.; Meanwell, N. A.; Gribkoff, V. K.; Boissard, C. G.; Dworetzky, S. I.; Natale, J.; Moon, S.; Ortiz, A.; Yeleswaram, S.; Pajor, L.; Gao, Q.; Starret, J. E. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 528-542. c) Bakavoli, M.; Rahimizadeh, M.; Shiri, A.; Akbarzadeh, M.; Mousavi, S-H.; Atapour-Mashhad, H.; Tayarani-Najaran, Z. *J. Chem. Res.* **2010**, 34, 403-406.

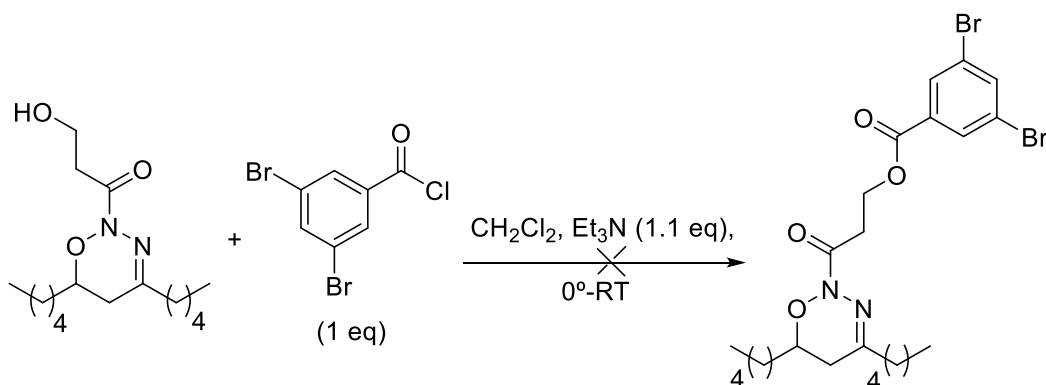
Dado que el compuesto **24** es un aceite viscoso incoloro, se decidió llevar a cabo modificaciones químicas con una doble finalidad: por una parte, intentar sintetizar derivados sólidos que nos permitiesen obtener monocristales para ser analizados por rayos X y, por otra, preparar análogos que nos permitan contrastar las actividades biológicas con el metabolito secundario **24**.

2.3.5.3 Preparación de derivados del compuesto **24**.

Los análogos semisintéticos más inmediatos que nos propusimos preparar, por la simplicidad de las reacciones y por la pequeña cantidad aislada, fueron derivados acilados en el grupo hidroxilo. Se llevaron a cabo tres reacciones de acilación:

a) Acilación con cloruro de 3,5-dibromobenzoilo (Esquema 2).

Se consideró que las interacciones de tipo π - π y la presencia de átomos pesados, como el bromo, podrían conducir a un producto sólido.



Esquema 2. Reacción de acilación de **24** con cloruro de 3,5-dibromobenzoilo.

Sin embargo, se obtuvo una mezcla compleja de productos en los que predominaba el producto de eliminación (figura 21).

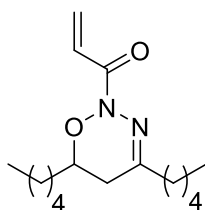
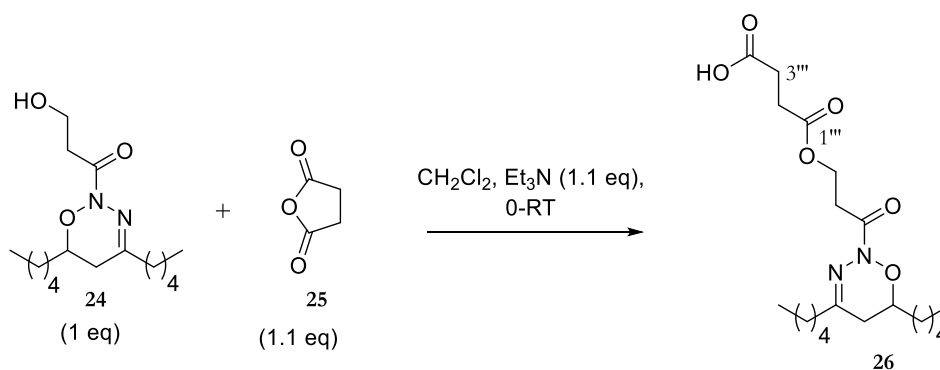


Figura 21. Producto de eliminación resultante de la reacción de acilación.

b) Acilación con anhídrido succínico (Esquema 3)

Se decidió, alternativamente, utilizar anhídrido succínico **25** para hacerlo reaccionar con **24**, ya que este análogo tendría un grupo carboxilo terminal para generar enlaces de hidrógeno, con lo que se esperaba obtener un producto sólido. La reacción se realizó siguiendo el esquema sintético 3.



Esquema 3. Reacción de acilación de **24** con anhídrido succínico.

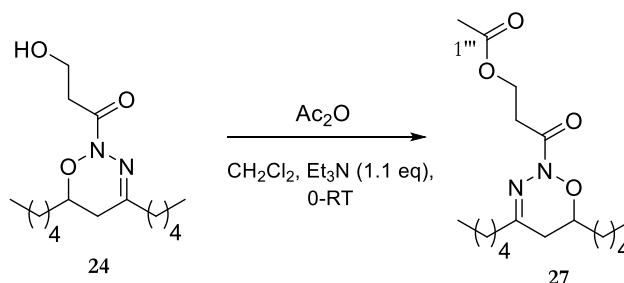
En este caso se obtuvo el producto deseado y fue caracterizado mediante el estudio de RMN. Los cambios más reseñables respecto al espectro de **24** fueron el cambio de δ_{H} 4.45 (H-3'') cuyo carbono se desapantalla hasta δ_{C} 60.7 (C-3''). La señal multiplete a δ_{H} 2.63 (H-2''' y H-3'''), se corresponde con los dos metilenos del succinato; dichos metilenos aparecen a δ_{C} 29.2. La conexión con el nuevo sistema de spin fue confirmada mediante HMBC, ya que H-2'' y H-2''' poseen correlación $^{2,3}\text{J}$ con el carbono cuaternario δ_{C} 171.5 (C-1'') que, además, muestra desplazamiento característico del grupo funcional éster. El carbono cuaternario del grupo carboxílico resuena a δ_{C} 177.3.

A pesar de obtenerse el producto deseado, el aspecto físico del mismo continuaba siendo un aceite incoloro, el cual no consiguió precipitarse en ningún disolvente. Llegados a este punto, se determinó que, debido a las cadenas alquílicas laterales, el producto mantenía su aspecto aceitoso.

A causa de la cantidad aislada, no fue plausible preparar más derivados. No obstante, se decidió preparar un último análogo con anhídrido acético para observar la repercusión del grupo hidroxilo sobre la actividad biológica.

2.3.5.4 Síntesis del análogo **27**.

Siguiendo las mismas condiciones que en el esquema 3, pero utilizando anhídrido acético, se obtuvo el derivado acetilado **27** (esquema 4).



Esquema 4. Producto semisintético **27**.

La estructura química se corroboró mediante RMN. En el espectro de RMN- ^1H a δ_{H} 2.06 (3H, s, H-2''') se observaban los protones del metilo correspondientes al grupo

acetilo. En RMN- C^{13} resuenan las señales a δ_c 20.92 (C-2'') y 171.01 (C-1'') correspondientes al metilo del grupo acetilo y al carbonilo del éster, respectivamente.

2.3.6 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Se han llevado a cabo los ensayos de actividad del producto natural **24** y de sus análogos **26** y **27**.

2.3.6.1 Actividad biológica in vitro

Actividad antitumoral

Se realizaron las pruebas de actividad antitumoral en diferentes líneas celulares (tabla 6).

Tabla 6. IC_{50} en las distintas líneas celulares tumorales ensayadas.

| | MCF7 IC_{50} (nM) | CAL33 IC_{50} (nM) | HT-29 IC_{50} (nM) | T98G IC_{50} (nM) | PC3 IC_{50} (nM) | NCI- H1299 IC_{50} (nM) | SK-UT- 1 IC_{50} (nM) | HOS IC_{50} (nM) | AU565 IC_{50} (nM) |
|-----------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 24 | 127 | 42.7 | 100 | 106 | 217 | 192 | 199 | 170 | 1000 |
| 26 | N.D | 750 | 750 | N.P. | N.P. | N.P. | N.P. | N.P. | N.P. |
| 27 | 250 | 100 | 50 | N.P. | N.P. | N.P. | N.P. | N.P. | N.P. |

N.D. No detectado. N.P. No probado.

El producto **24** inhibió la proliferación de todas las líneas celulares, aunque se observaba variabilidad en la concentración óptima de inhibición. La línea celular más sensible fue la derivada de un tumor de cabeza y cuello (CAL33) cuyo valor de IC_{50} era 42.7 nM. Se determinó que la segunda línea más sensible era la derivada de un cáncer epitelial de colon (HT-29) con un valor de IC_{50} igual a 100 nM; con un resultado similar se inhibía la línea de glioblastoma multiforme (T98G). En el resto de líneas celulares, la inhibición empezaba a ser relevante a una concentración de 100 nM y óptima a una concentración que variaba entre 250 y 500 nM. La línea más resistente al tratamiento fue la derivada de un tumor de mama (AU565), cuyo IC_{50} era de 1 μ M.

El compuesto **26** exhibió inhibición moderada para las líneas celulares CAL33 y HT-29. En el caso de la línea tumoral MC7, no ocurría inhibición a ninguna de las concentraciones. Estos resultados hacen suponer que la presencia del ácido carboxílico y el intrínseco aumento de la polaridad repercuten negativamente sobre la actividad.

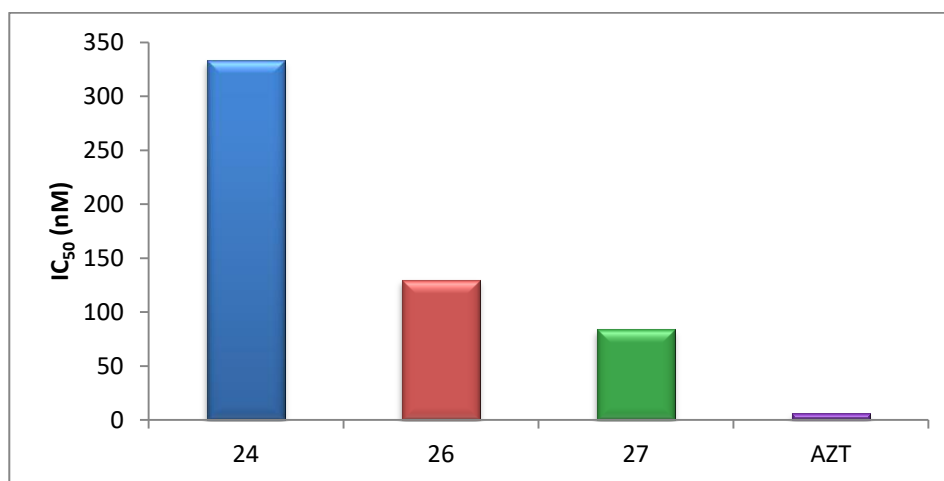
El análogo **27** mostró inhibición sobre las líneas tumorales en las que fue ensayado. Sin embargo, en el caso de las líneas de cáncer de mama (MCF7) y cáncer de cabeza y cuello (CAL33), los valores de IC_{50} resultaron inferiores en ambos casos respecto al metabolito natural. En el caso del cáncer epitelial de colon (HT-29), sí ocurre un aumento de la actividad biológica respecto a **24**, al obtenerse un valor de IC_{50} 50 nM.

Actividad anti-VIH

Se evaluó la actividad anti-VIH de la molécula **24** y sus derivados semisintéticos **26** y **27**. Para ello, se compararon frente al fármaco comercial conocido como AZT utilizando un modelo *Wyld type* con células tumorales MT-2 (tabla 7).

Tabla 7. Inhibición de VIH sobre un modelo *Wyld type*.

| | 24 | 26 | 27 | AZT |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| IC₅₀ (nM) | 333 | 130 | 84 | 6 |
| CC₅₀ (nM) | 5000 | 8203 | 7720 | - |
| SI | 15 | 63 | 91 | - |



A pesar de que ninguno de los tres compuestos igualó la actividad del AZT, los datos iniciales fueron muy alentadores, puesto que todas las moléculas manifestaban actividad en el rango de nM. Además, las modificaciones realizadas sobre el producto natural repercutían positivamente sobre la actividad biológica, siendo la acetilación del grupo hidroxilo la que mayor influencia producía.

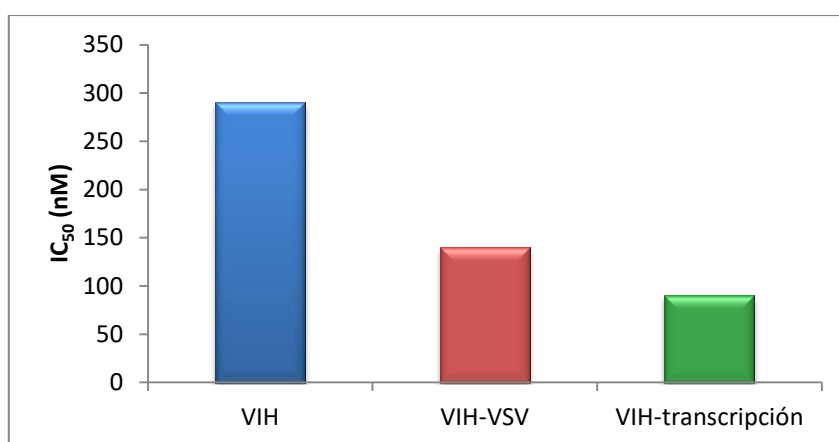
La viabilidad celular, que es una medida de la citotoxicidad *in vitro*, fue apropiada en las tres moléculas con una CC₅₀ > 1 μM, lo cual da un perfil de seguridad adecuado. Con estos valores, se determinó el índice de selectividad (SI), el cual nos da la discriminación existente entre la célula y el virus. Los dos análogos hemisintéticos, además de mejorar en actividad, eran más selectivos que el metabolito natural (tabla 7). Una vez obtenidos estos resultados, se decidió investigar sobre el mecanismo de inhibición viral, para ello se utilizó **24**.

El primer ensayo llevado a cabo fue probar la actividad antiviral sobre linfocitos activados de sangre periférica (PBMLCs), obteniéndose un IC₅₀ = 362 nM y CC₅₀ > 1 μM. El hecho de que sea activo en células no tumorales apoya la hipótesis de un papel antiviral directo. Sin embargo, no se puede excluir que el factor celular sobre el que actúa sea común al ciclo viral y celular, como puede ser: un factor de transcripción, una proteína del ciclo celular o un checkpoint.

El siguiente punto para identificar el mecanismo de acción fue llevar a cabo ensayos de actividad sobre la entrada (tabla 8) infectando en paralelo virus VIH NL4.3-Ren, y virus pseudotipado con la envuelta del VSV (vesicular stomatitis virus), NL4.3-VSV-Luc. Se obtuvo una $IC_{50} = 0.29 \mu M$ para NL4.3-Ren y de $IC_{50} = 0.14 \mu M$ para NL4.3-VSV-Luc; esto sugiere que la actividad no dependía de la entrada viral. Los resultados sobre el proceso de transcripción viral dieron valores de $IC_{50} = 90 \text{ nM}$, que apoyaría la hipótesis de que la inhibición del virus se realiza a nivel transcripcional.

Tabla 8. Estudio del mecanismo inhibitorio de **24** sobre la entrada y transcripción viral.

| | VIH | VIH-VSV | VIH-transcripción |
|----------------|-----|---------|-------------------|
| IC_{50} (nM) | 290 | 140 | 90 |



El estudio a nivel transcripcional (tabla 9) mostró que en células MT-2 se inhibía la transcripción del VIH mediada por LTR además de inhibirse también la actividad de NF- κ B y SP-1, y en menor proporción ocurría la inhibición de NFAT y AP1. Sin embargo, no se observaba inhibición de los factores transcripcionales en PMBCs humano, estando delimitada la acción inhibitoria a células tumorales. Esta discrepancia plantea la existencia de dos mecanismos de acción diferentes, uno sobre células tumorales y el otro sobre linfocitos normales no transformados.

Tabla 9. Actividad sobre la transcripción mediada por LTR del VIH, promotor del CMV y los factores de transcripción NF- κ B, SP1, NFAT, AP1 en células MT-2 y PMBCs humanos.

| | LTR-luc IC_{50} (nM) | NF- κ B-luc IC_{50} (nM) | NFAT-luc IC_{50} (nM) | SP1-luc IC_{50} (nM) | AP1-luc IC_{50} (nM) | CMV-luc IC_{50} (nM) |
|-------------|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| MT-2 | 260 | 0.41 | 1370 | 190 | 1100 | 190 |
| PMBC | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 |

Estos hallazgos están correlacionados con la acción antitumoral, pero abren el interrogante sobre cómo se bloquea la infección por el VIH en linfocitos naturales.

Actividad anti-oxidante

La actividad anti-oxidante de **24**, **26** y **27** se midió a través de la prueba con DPPH, y sobre cultivos celulares utilizando células THP-1 (tabla 10). Antes de llevar a cabo los experimentos celulares se midió la toxicidad, y en todos los casos se determinó una $CC_{50} > 1 \mu M$.

Tabla 10. *Actividad antioxidante total y actividad antioxidante celular sobre THP-1.*

| | Citotoxicidad CC_{50} (μM) | Actividad antioxidante total IC_{50} (nM) | Actividad antioxidante celular IC_{50} (nM) |
|-----------|--|---|--|
| 24 | >1 | 9.7 | 10.5 |
| 26 | >1 | 4.6 | 8.2 |
| 27 | >1 | 3.3 | 3.4 |

Los tres mostraron actividad antioxidante en el rango de nM bajo tanto en el ensayo químico como sobre la actividad antioxidante celular. El derivado **27** fue, una vez más, el que mejores resultados presentaba.

Actividad anti-inflamatoria

En el caso de la actividad anti-inflamatoria se investigaron las moléculas sobre las dianas farmacológicas: TNF- α , NF- κB y STAT3. En la tabla 11, se muestran las actividades sobre cada diana.

Tabla 11. *Actividad inhibitoria sobre las dianas causantes de inflamación TNF- α , NF- κB y STAT3.*

| | TNF- α IC_{50} (nM) | NF- κB IC_{50} (nM) | STAT3 IC_{50} (nM) |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| 24 | 14.8 | 56.3 | 1.6 |
| 26 | 32.5 | 63.6 | 3.1 |
| 27 | 3.5 | 5.2 | 0.1 |

Las moléculas mostraron actividad inhibitoria para todas las dianas analizadas, siendo **27** la más potente en todos los casos. En el caso de **26** se observaba pérdida de actividad frente al metabolito natural **24**, evidenciando que un aumento del carácter hidrofílico repercute negativamente en la actividad.

TNF- α es una de las citocinas proinflamatorias más arquetípicas, siendo liberada cuando ocurre una herida o una infección. Se encarga también de activar el complejo proteico NF- κB , que produce la expresión de genes pro-inflamatorios incluyendo citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión.⁹⁵ Los datos hacen evidenciar que la diana biológica, es TNF- α , puesto que ocurre una disminución del IC_{50} respecto a NF- κB . Este hecho, es muy marcado sobre **24**.

⁹⁵ Lawrence, T. *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* **2009**, 1, 1-10.

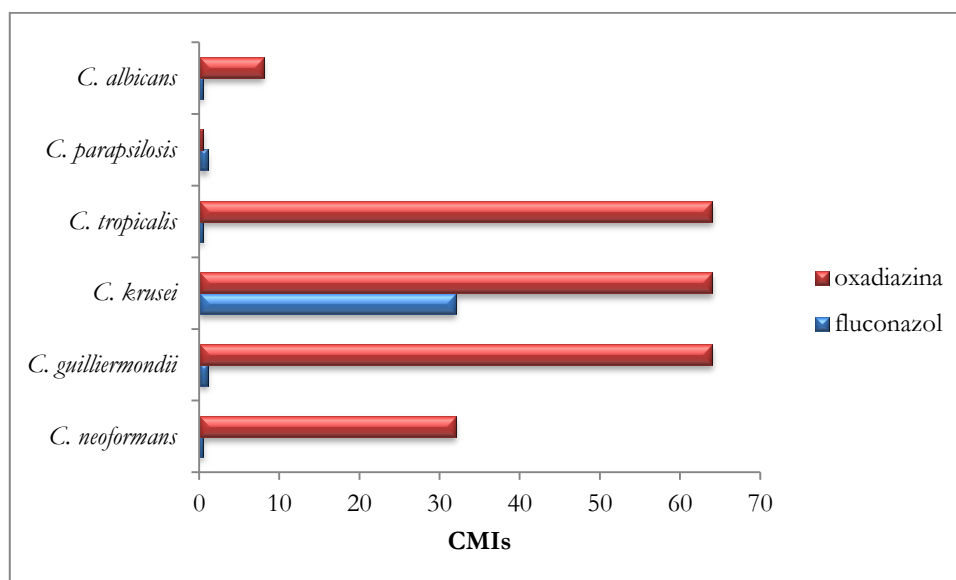
La activación de la ruta de transcripción JAK2/STAT3 induce la expresión de múltiples genes, incluyendo genes pro-inflamatorios y pro-fibróticos.⁹⁶ Además de su actividad pro-inflamatoria, la desregularización de la ruta transcripcional está asociada con distintos tipos de cáncer.⁹⁷ Frente a esta diana se produjo la mayor inhibición con un valor de IC₅₀ 140pM para **27**. Estos datos revelan que la actividad antiinflamatoria también ocurre a través de esta ruta metabólica y lleva a pensar que puede ser una diana clave en la actividad antitumoral.

Actividad antifúngica

Para evaluar la actividad antifúngica de **24** sobre levaduras, se determinó la CMI como aquella concentración que inhibía el crecimiento un 50% comparado con el medio de cultivo sin tratamiento. El control positivo para el caso de levaduras fue fluconazol (tabla 12).

Tabla 12. Valores de CMI sobre levaduras patógenas.

| | Fluconazol | 24 |
|--------------------------------|------------|-----------|
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 0.5 | 32 |
| <i>Candida guilliermondii</i> | 1 | >64 |
| <i>Candida krusei</i> | 32 | >64 |
| <i>Candida tropicalis</i> | 0.5 | 64 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 1 | 0.5 |
| <i>Candida albicans</i> | 0.5 | 8 |



⁹⁶ Gao, Q.; Liang, X.; Shaik, A. S.; Zang, J.; Xu, W.; Zhang, Y. *Curr. Drug Targets*. **2018**, *19*, 487-500.

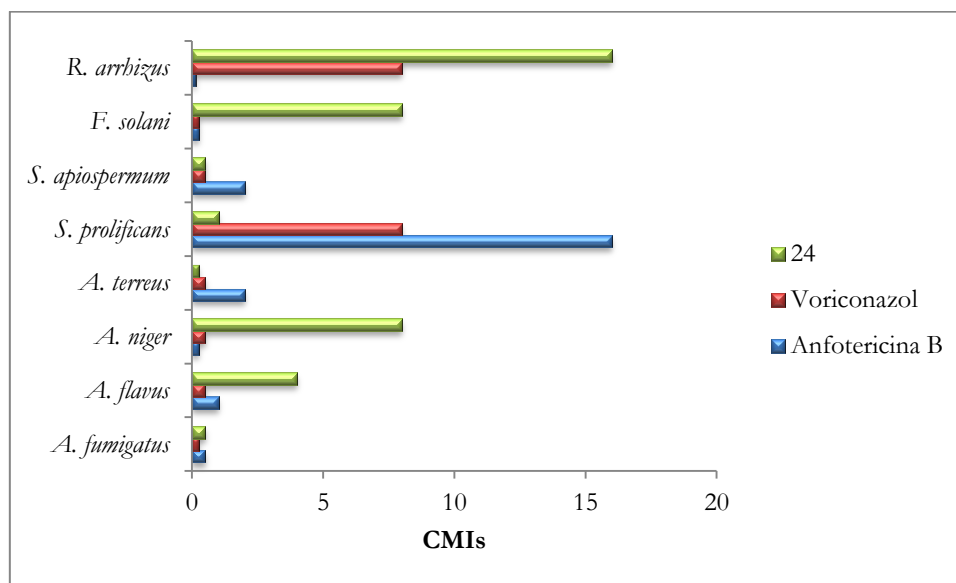
⁹⁷ a) Hodge, D. R.; Hurt, E. M.; Farrar, W. L. *Eur. J. Cancer*. **2005**, *41*, 2502-2512. b) Gritsina, G.; Xiao, F.; O'Brien, S. W.; Gabbasov, R.; Maglaty, M. A.; Xu, R. H.; Thapa, R. J.; Zhou, Y.; Nicolas, E.; Litwin, S.; Balachandran, S.; Sigal, L. J.; Huszar, D.; Connolly, D. C. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *4*, 1035-1047.

La oxadiazina natural exhibió baja actividad frente a todas las levaduras patógenas utilizadas, excepto para *Candida parapsilosis*. En el caso de esta levadura se observaba una actividad inhibitoria clara, equivalente a la del fluconazol.

Para el caso de hongos filamentosos, la CMI se definió como el 100% de inhibición. Se utilizaron como antifúngicos de control anfotericina B y voriconazol (tabla 13).

Tabla 13. Valores de CMI sobre hongos filamentosos.

| | Anfotericina B | Voriconazol | 24 |
|---------------------------------|----------------|-------------|------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 0.5 | 0.25 | 0.5 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 1 | 0.5 | 4 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 0.25 | 0.5 | 8 |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 2 | 0.5 | 0.25 |
| <i>Scedosporium prolificans</i> | 16 | 8 | 1 |
| <i>Scedosporium apiospermum</i> | 2 | 0.5 | 0.5 |
| <i>Fusarium solani</i> | 0.25 | 0.25 | 8 |
| <i>Rhizopus arrhizus</i> | 0.12 | 8 | >16 |



Los resultados indicaban que la oxadiazina no es activa frente a *Rhizopus*, *Fusarium* y *Aspergillus niger*. En el resto de los casos, los valores de actividad eran similares o algo inferiores a otros antifúngicos como el voriconazol. Cabe destacar el resultado en *Scedosporium prolificans*, un hongo multiresistente a otros antifúngicos, como voriconazol o anfotericina B, y frente al cual no existen tratamientos eficaces.

2.3.6.2 Actividad biológica in vivo

A tenor de los prometedores resultados *in vitro*, se decidieron llevar a cabo estudios toxicológicos *in vivo* para determinar si el metabolito natural mostraba efectos no deseados sobre ratones (ver desarrollo experimental, 2.5.2.2). Se trataron 4 grupos de ratones a diferentes dosis:

- **Grupo 1:** 700 μg /inyección.
- **Grupo 2:** 100 μg /inyección.
- **Grupo 3:** 50 μg /inyección.
- **Grupo 4:** control negativo.

Se controló la pérdida de peso durante la primera semana de tratamiento como indicador de toxicidad inicial. Los ratones con la dosis de 100 μg y 50 μg no mostraban signos de toxicidad; no se observaba pérdida de peso aparente y se mostraban activos, sin signos de enfermedad. Sin embargo, en el grupo tratado a 700 μg se observó pérdida de peso y signos de enfermedad, debido a esto, se redujo la dosis a 350 μg por inyección tras la primera semana.

Tras completar una semana del tratamiento, el grupo con dosis de 700 μg presentaba signos evidentes de toxicidad entre los que se incluían: espaldas arqueadas, pérdida de brillo en el pelo y movimientos lentos. Tras reducir la dosis a 350 μg se recuperó la pérdida de peso, pero, a pesar de esto, no fue posible prevenir el 100% de la mortalidad en este grupo de ratones. En todos los grupos tratados aparecía una rigidez distintiva en la zona de inyección, indicando una potencial reacción adversa; este efecto era más acentuado en los ratones del grupo 1 (figura 22).



Figura 22. *Rigidez distintiva en la zona de inyección, ratón número 9 del Grupo 1.*

Los ratones de los grupos 2 y 3 se mostraron activos a lo largo de todo el experimento sin encontrarse síntomas de enfermedad, espaldas arqueadas o pérdida de brillo en el pelo. Las fluctuaciones de peso en estos grupos a lo largo del experimento, fueron las estándar.

En la figura 23, se muestra la variación de peso para los tres grupos a lo largo de todo el experimento.

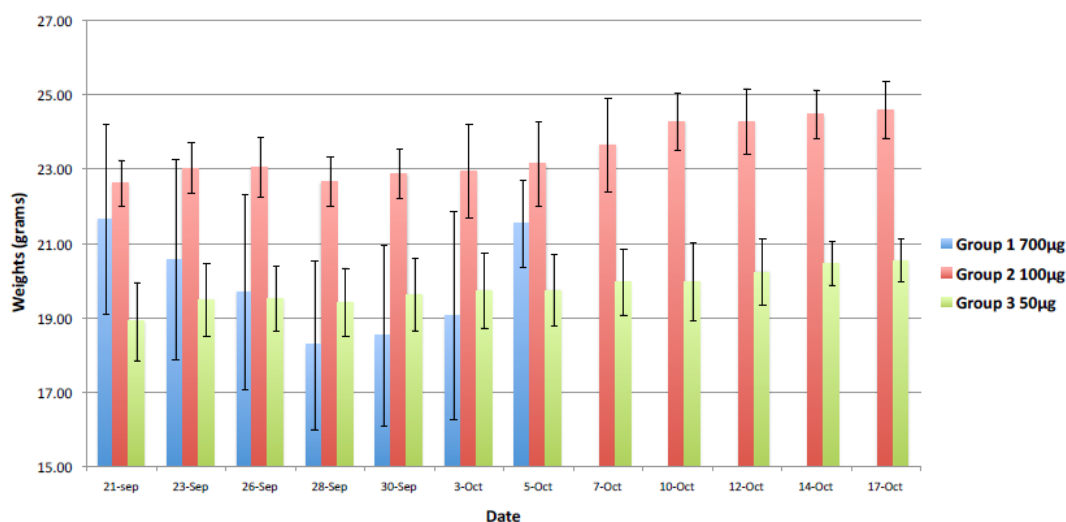


Figura 23. Evolución del peso en los grupos tratados a lo largo del tratamiento.

En el caso de los ratones del grupo 1, su mortalidad llegó al 100% en la séptima semana de tratamiento, y de la observación fisiológica se concluye que a esta dosis el metabolito produce toxicidad generando pérdida de peso, signos de enfermedad y angustia en todos los ratones tratados. A dosis menores no se identificó toxicidad aguda.

Como muestra la figura 24, a nivel macroscópico los órganos no mostraron diferencia entre los ratones tratados y los ratones control.

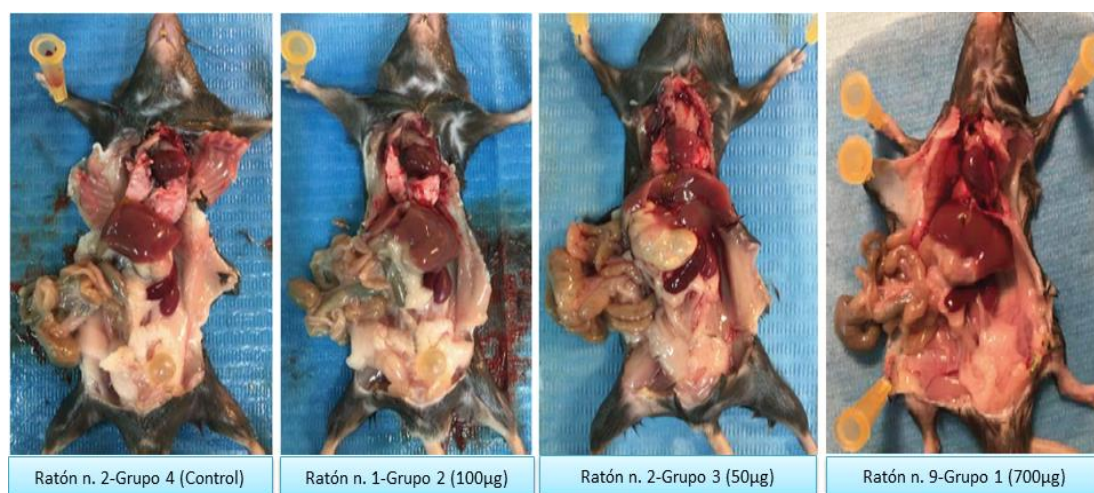


Figura 24. Necropsia de los diferentes grupos de ratones objeto de estudio.

Tras realizarse la observación macroscópica y no detectarse ningún signo apreciable de toxicidad, se realizaron los cortes histológicos de: cerebro, intestino, corazón, hígado, riñón y páncreas. En el análisis histológico no aparecían signos de inflamación, necrosis, fibrosis o hiperplasia. Es significativo el caso del grupo tratado a 700 µg que mostró una histología normal, donde no se observaban signos de toxicidad u órganos dañados.

El análisis hematológico (figura 25) mostró que niveles de los glóbulos rojos (RBC) y hemoglobina (HGB) no difería entre los grupos tratados (Grupos 1-3) y el grupo control (Grupo 4). En los glóbulos blancos (WBC) sí se ocurría variación entre los grupos tratados

y el grupo control; este efecto estaba sobre todo acentuado en los linfocitos (LYM). Es importante reseñar que, aunque los valores fueran menores en los ratones tratados, todos comprendían los rangos normales establecidos. Estos datos sugieren que la oxadiazina está afectando a las células que se están dividiendo continuamente, y estaría en consonancia con su actividad antitumoral.

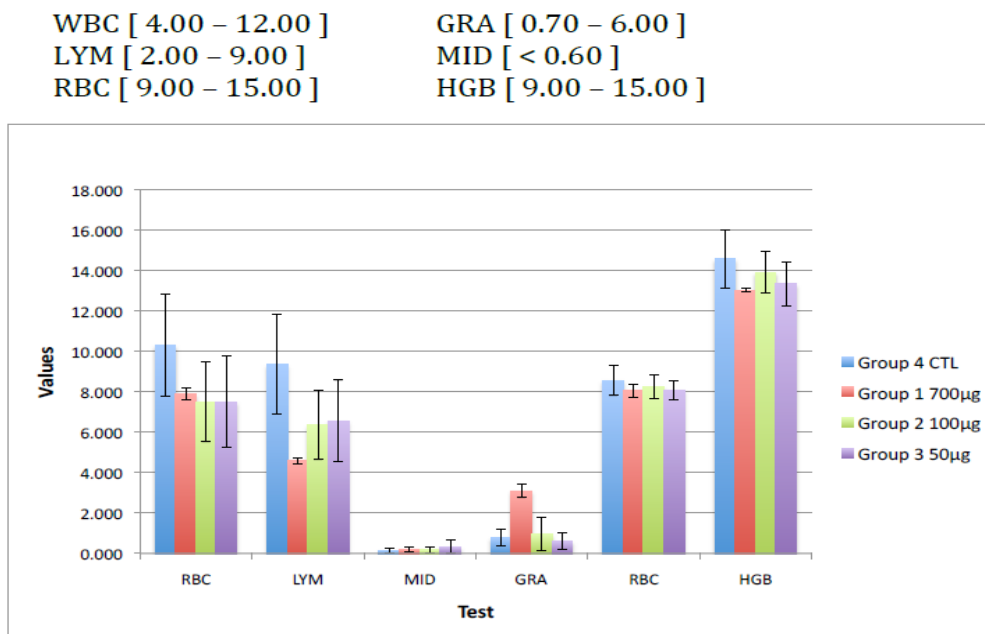


Figura 25. *Análisis hematológico de los grupos objeto de estudio.*

Para medir el nivel de hepatotoxicidad se realizó la prueba de la alanina aminotransferasa (ALT) (figura 26), el tratamiento continuado inducía un aumento de los valores de ALT, sugiriendo toxicidad hepática. Este efecto parece ser independiente del disolvente utilizado (42% EtOH:58% H₂O), ya que el incremento de ALT es dependiente de la dosis. En el grupo 1, la sangre sólo fue extraída de dos ratones por lo que los datos no son estadísticamente significativos y no ha sido posible explicar el por qué en estos dos ratones la actividad sobre ALT es inferior al control.

La prueba de la ALT sugirió que el compuesto produce hepatotoxicidad, sin embargo, esta puede verse aumentada por la elección del disolvente utilizado para administrar la muestra. La utilización de una disolución fisiológica salina se considera que podría repercutir favorablemente en la disminución de la ALT.

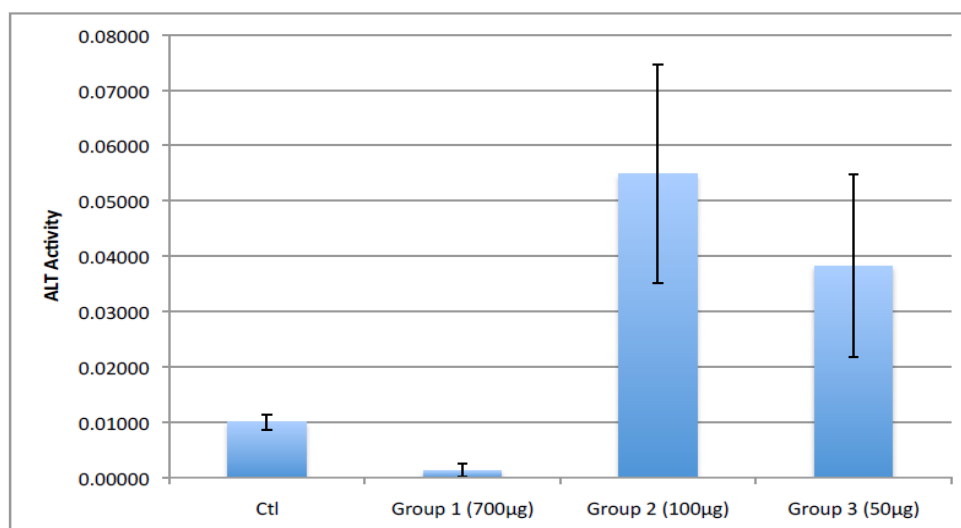


Figura 26. Análisis de la actividad sobre ALT grupos objeto de estudio.

Con los buenos datos logrados *in vivo*, el siguiente paso sería desarrollar las pruebas de biodisponibilidad y determinar las correspondientes actividades biológicas. Pero el coste asociado, era demasiado alto para ser afrontado por la empresa.

De este trabajo se han obtenido dos patentes.⁹⁸ Sin embargo, en el mismo mes de presentación de la aceptación a trámite, se hizo pública una patente en la República Checa,⁹⁹ donde se describían exactamente el mismo metabolito activo, al cual denominaron Nocuoilin A. Posteriormente, el mismo grupo de investigación publicó un artículo con la caracterización estructural y la actividad antitumoral del mismo.¹⁰⁰ A pesar de esto, la empresa Valoralia I más D tiene propiedad de explotación de los usos de la invención en la Unión Europea, Japón y Estados Unidos.

2.3.7 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN EO-218 D

La fracción EO-218 D resultó la más polar y se purificó por cromatografía en columna de sílica, utilizando como eluyente un gradiente que iba desde CH₂Cl₂-MeOH (20:1) hasta CH₂Cl₂-MeOH (7:1). Se obtuvieron cinco fracciones (I-V), donde las fracciones I, IV y V exhibían actividad moderada antioxidante y antiinflamatoria.

Los componentes de esta fracción, además de ser los más polares, fueron los más abundantes del extracto EO-218.

⁹⁸ a) Tena, P. V.; Rumero, S. A.; Rosero, V. D. F.; Ortega, D. M.; Maderuelo, C. S.; Hernández, C. A.; González, F. A. M. Dihydrooxadiazine compounds for treating infections and cancer. PCT/EP2016/082843, 27/05/2016. b) Tena, P. V.; Rumero, S. A.; Rosero, V. D. F.; Ortega, D. M.; Maderuelo, C. S.; Hernández, C. A. Compounds having antiinfective, antitumoral and antifungal activity. PCT/EP2018/060518, 25/04/2018.

⁹⁹ Hrouzek, P.; Voracova, K.; Kuzma, M.; Hajek, J.; Hajek, J.; Urajova, P.; Horna, J. C.; Mares, J.; Lukesova, A.; Voloshko, L.; Pinevich, A.; Kopecky, J.; Villunger, A. Isolated Nostoc sp. and isolated Nodularin strain, cyanide metabolite and its manufacturing method and use as drug. CZ/305944, 11/05/2016.

¹⁰⁰ Hrouzek, P.; Voracova, K.; Kuzma, M.; Hajek, J.; Hajek, J.; Urajova, P.; Horna, J. C.; Mares, J.; Lukesova, A.; Voloshko, L.; Pinevich, A.; Kopecky, J.; Villunger, A. PLoS ONE. **2017**, *12*, 1-20.

El análisis de RMN- H^1 de esta fracción mostró tres zonas bien diferenciadas: a) una zona propia de cadenas alifáticas (δ_H 0.7-2.3), b) una zona típica de carbohidratos, por la presencia de grupos funcionales hidroxilados (δ_H 3.3-4.5) y c) una zona típica de protones olefinicos (δ_H 5.1-5.4). Teniendo en cuenta estos datos espectroscópicos y el hecho de que sean los componentes mayoritarios en esta cianobacteria, se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica, y se confirmó que los metabolitos de dicha fracción pertenecen a la familia de los glicolípidos.¹⁰¹ Los glicolípidos se corresponden con moléculas de tipo anfifílicas, las cuales tienen una cabeza de carácter hidrofílica, conformada por un azúcar, un resto glicerol (en algunos casos) y una cola hidrofóbica, que se corresponde con ácidos grasos de cadena larga (figura 27). En esta fracción se han aislado e identificado: monogalactosil-diacilglicerol (MGDG), digalactosil-diacilglicerol (DGDG), heterocisto glicolípido (HG) y monoglucosil-diacilglicerol (MGlcDG).

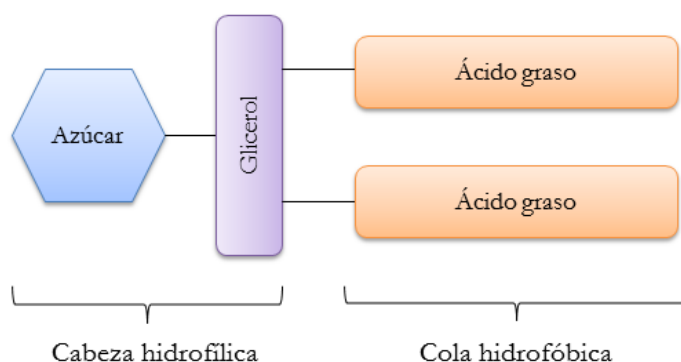
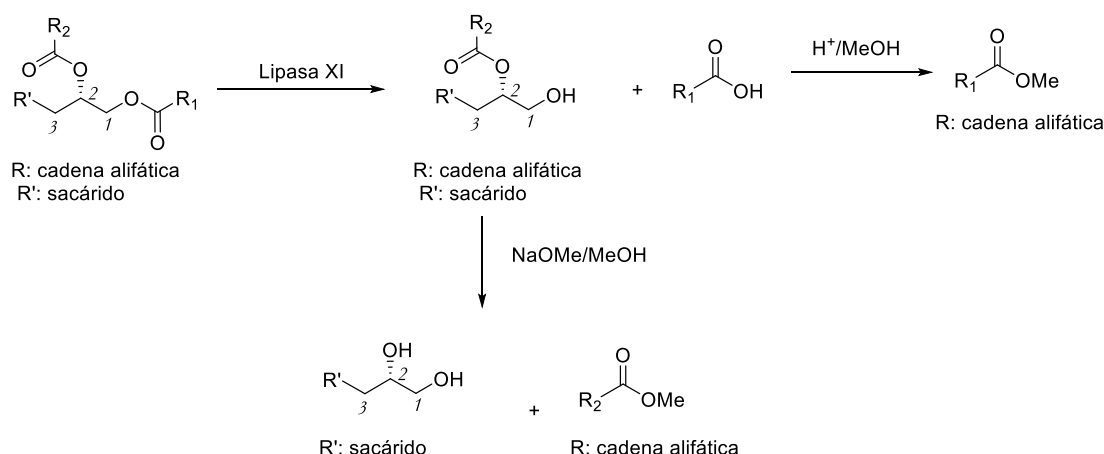


Figura 27. Estructura general de los glicolípidos.

Debido a que la composición de los ácidos grasos de estos glicolípidos consiste en una mezcla de cadenas alifáticas de diferente longitud y grado de insaturación, se ha realizado un estudio de RMN y un estudio de las cadenas de los correspondientes ácidos grasos por GC/MS, que se han obtenido por hidrólisis específica enzimática y química (esquema 5).

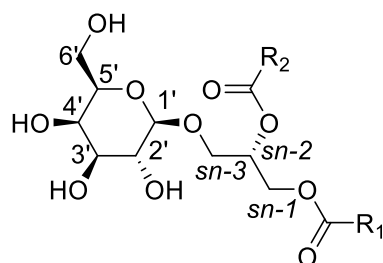
¹⁰¹ a) Awai, K.; Kakimoto, T.; Awai, C.; Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Takamiya, K.; Wada, H.; Ohta, H. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 1120-1127. b) Nuzzo, G.; Gallo, C.; d'Ippolito, G.; Cutignano, A.; Sardo, A.; Fontana, A. *Mar. Drugs.* **2013**, *11*, 3742-3753.



Esquema 5. Procedimiento para la hidrólisis selectiva enzimática y química de los ácidos grasos.

2.3.7.1 Determinación estructural del EO-218 D-I (**28** y **29**)

Los datos de RMN ponen de manifiesto que se trata de una mezcla de glicolípidos, 3- β -D-galactosil-1,2-diacyl-*sn*-glicerol (MGDG, figura 28), donde las posiciones C-1 y C-2 del glicerol se encuentran aciladas con ácidos grasos y la posición C-3 se encuentra glicosilada con un resto de β -D-galactosa. Las señales más características son las del carbono anomérico β , δ_C 105.3 y δ_H 4.24 (1H, d, J= 7.2 Hz), y las del resto glicerol, δ_{C-sn1} 62.3 (CH₂) δ_{H-sn1a} 4.12 (1H, m), δ_{H-sn1b} 4.34 (1H, m), δ_{C-sn2} 70.2 (CH) δ_{H-sn2} 5.26 (1H, m) y δ_{C-sn3} 67.34 (CH₂) δ_{H-sn3a} 3.90 (1H, m), δ_{H-sn3b} 3.64 (1H, m). La determinación de los ácidos grasos se ha llevado a cabo mediante hidrólisis enzimática e hidrólisis química y, posterior análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por GC/MS (ver desarrollo experimental, 2.5.8.3).



| | R ₁ COOH | R ₂ COOH |
|----|---------------------|---------------------|
| 28 | Ácido oleico | Ácido palmítico |
| 29 | Ácido palmítico | Ácido palmítico |

Figura 28. Estructura química de los MGDG aislados.

El estudio de GC/MS indicó que el compuesto mayoritario (**28**) es aquel cuya posición *sn*-1 del glicerol se encuentra acilada con un resto de ácido oleico y la posición *sn*-2 está esterificada con un resto de ácido palmítico; mientras que, el metabolito minoritario (**29**) contiene las dos posiciones del glicerol esterificadas con ácido palmítico.

Los datos espectroscópicos se adecuaban a los descritos previamente.¹⁰²

2.3.7.2 Determinación estructural de EO-218 D-III (30 y 31)

Siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior, se elucidaron las moléculas **30** y **31** como una mezcla de 3-[α -D-galactosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactosil]-1,2-diacil-*sn*-glicerol (DGDG, figura 29).

La diferencia entre estos glicolípidos y los anteriores (**28** y **29**) radica en el resto glicósido, que se trata de un disacárido formado por dos unidades de galactosa, como se puede observar en los espectros de RMN (ver desarrollo experimental, 2.5.7). El análisis detallado de los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C indica la presencia de un segundo carbono anomérico a δ_{C} 100.6 y un desapantallamiento de C-6' hasta δ_{C} 67.4. Estos datos confirmaron la configuración α y una unión de tipo 1-6 entre los dos residuos de galactosa. Las señales correspondientes al resto glicerol mostraban desplazamientos muy similares a los de los compuestos **28** y **29**. La información obtenida de RMN es concordante con la descrita en la bibliografía.¹⁰¹

En el análisis de los restos de ácidos grasos que se encuentran esterificando las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol, se detectaron los mismos restos de ácido grasos, pero en distinta proporción que para los compuestos **28** y **29**. En este caso, el compuesto mayoritario (**31**) contiene dos restos de ácido palmítico acilados, y el metabolito minoritario (**30**), presenta acilada la posición *sn*-1 con un resto de ácido oleico, y la posición *sn*-2 se encuentra esterificada con ácido palmítico, como figura en el esquema II (figura 29).

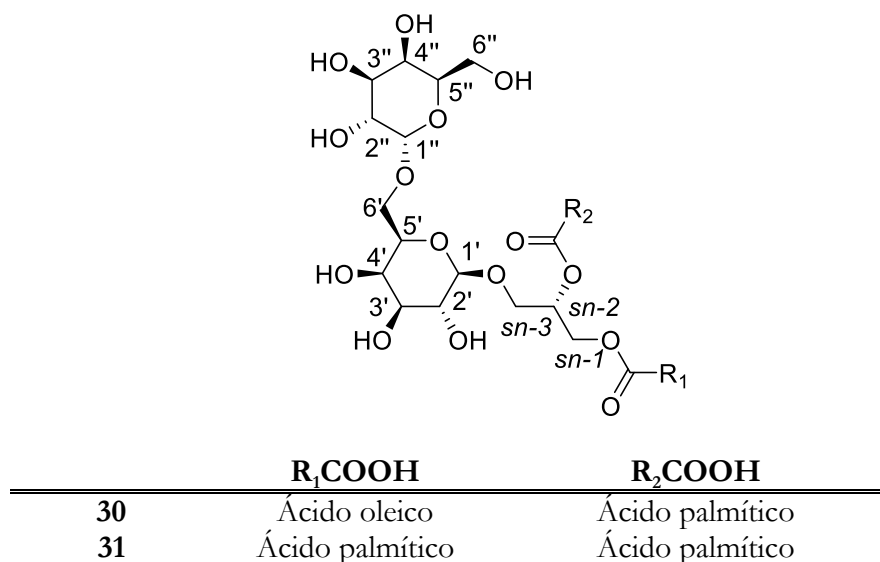


Figura 29. Estructura química de los DGDG.

¹⁰² Reshef, V.; Mizrahi, E.; Maretzki, T.; Silberstein, C.; Loya, S.; Hizi, A.; Carmeli, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1251-1260.

2.3.7.3 Determinación estructural de EO-218 D-IV (32)

Este metabolito, pese a ser un glicolípido, difiere significativamente de los aislados hasta el momento, no mostrando restos de glicerol ni de acilo.¹⁰³ Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C muestran un único resto de azúcar cuyo carbono anomérico presenta un δ_{H} 4.63 (d, $J=4.4$ Hz) y δ_{C} 98.6, señales típicas de un enlace glicosídico tipo α . Los datos de RMN se adecuaban a los de un resto glucosa.¹⁰¹ En el espectro de ESI-MS se detecta un pico molecular de $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z$ 599.4480, que se corresponde con una fórmula molecular de $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_8$. Por lo que, con los datos de RMN y la fórmula molecular, el resto de la molécula se compone de una cadena alifática larga funcionalizada con dos grupos hidroxilos. Se midió el poder rotatorio específico, resultando un valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +42^\circ$ [CHCl_3 :MeOH (2:1)]. Toda la información extraída de los espectros de RMN y masas (ver desarrollo experimental, 2.5.7), se adecúa a la bibliografía para el (3*R*,25*R*)-3,25-dihidroilheacosil- α -D-glucopiranosido (HG, figura 30).^{101, 102}

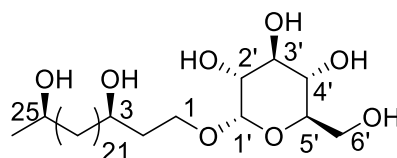


Figura 30. Estructura química del HG (32).

2.3.7.4 Determinación estructural de EO-218 D-V (33 y 34)

Finalmente, se aisló otra pareja de glicolípidos pero con un glicósido diferente a la galactosa, aunque con los mismos restos de ácidos grasos. Los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) poseen una gran similitud con los espectros de la pareja de compuestos **28** y **29**; no obstante, se observa un cambio significativo en el desplazamiento del carbono anomérico y de los carbonos correspondientes al glicósido. Un análisis de los datos de RMN (ver desarrollo experimental, 2.5.7) condujo a la estructura de 3- β -D-Glucosyl-1,2-diacyl-*sn*-glicerol (MGlcDG, figura 31), los cuales están en consonancia la bibliografía.¹⁰³

El estudio de los restos de ácidos grasos, según el método ya especificado, condujo a una mezcla de ácidos grasos en una proporción muy similar a la hallada en la pareja de moléculas **28** y **29**. Por tanto, el compuesto mayoritario es aquél que tiene un resto de ácido oleico en la posición *sn*-1 del glicerol y un resto de ácido palmítico en *sn*-2 del glicerol (**33**), mientras que el metabolito minoritario (**34**) es aquel que presenta estas dos posiciones del glicerol esterificadas con ácido palmítico (figura 31).

¹⁰³ a) Soriente, A.; Bisogno, T.; Gambacorta, A.; Romano, I.; Sili, C.; Trinccone, A.; Sodano, G. *Phytochemistry*. **1995**, *38*, 641-645. b) Gambacorta, A.; Pagnotta, E.; Romano, I.; Sodano, G.; Trinccone, A. *Phytochemistry*. **1998**, *48*, 801-805.

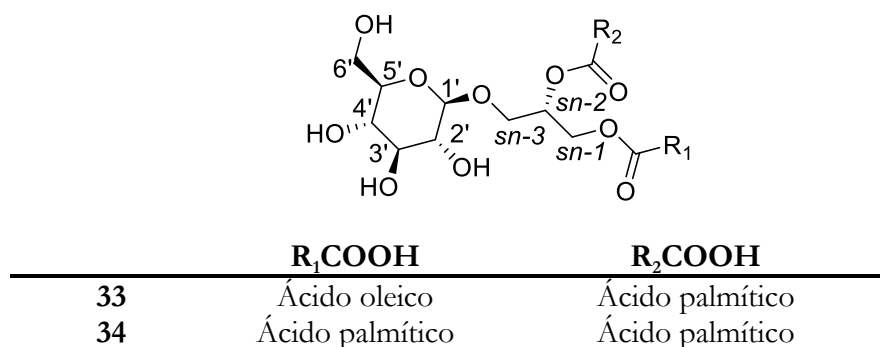


Figura 31. Estructura química de los MGlCDG (**33** y **34**).

Los glicoglicerolípidos tienen una función estructural de las membranas de tilacoides en los cloroplastos de los organismos fotosintéticos.¹⁰⁴ Se sabe que tienen gran relevancia estabilizando el fotosistema II y el complejo proteico de las clorofilas encargado de captar luz solar.¹⁰⁵ Debido a su gran abundancia, los glicoglicerolípidos tienen un papel fundamental en la determinación de las características de las membranas.¹⁰⁴ Los MGlCDG son precursores de los MGDG, ya que en cianobacterias no se ha identificado la galactosización directa del resto diacilglicerol, por lo que este tipo de glicolípidos se obtienen mediante la epimerización de C4' en los MGlCDG. Este proceso es clave para mantener un buen rendimiento fotosintético en las cianobacterias.¹⁰⁵

Las cianobacterias que fijan N_2 han evolucionado desarrollando un compartimento denominado heterocisto, que genera una separación espacial entre los procesos incompatibles, la fijación de N_2 y la producción de O_2 . Se ha determinado que para evitar la penetración de O_2 en los heterocistos existen dos capas protectoras, una capa de glicolípidos y otra de polisacáridos. La capa de glicolípidos está constituida principalmente de glicolípidos heterocistos, que son exclusivos de las cianobacterias.¹⁰³

2.3.7.5 Actividad biológica

Se probó la actividad anti-inflamatoria de todos los glicolípidos frente a $TNF-\alpha$ y $NF-\kappa B$ sobre células THP-1 (tabla 14).

Tabla 14. Actividad anti-inflamatoria mostrada por los glicolípidos **28-34**.

| | Viabilidad ($CC_{50} \mu M$) | Inhibición de $TNF-\alpha$ ($IC_{50} \mu M$) | Inhibición de $NF-\kappa B$ ($IC_{50} \mu M$) |
|--------------|-----------------------------------|--|---|
| 28-29 | >100 | 99.32 | >100 |
| 30-31 | 31.27 | 5.81 | 3.06 |
| 32 | 3.75 | 4.88 | 3.64 |
| 33-34 | 73.74 | 69.37 | 82.52 |

¹⁰⁴ Holzl, G.; Dormann, P. *Prog. Lipid Res.* **2007**, 46, 225-243.

¹⁰⁵ Boudiere, L.; Michaud, M.; Petroutsos, D. *Biophys. Acta.* **2014**, 1837, 470-480.

El HG **32** mostró citotoxicidad frente a células de tipo THP-1, por lo que, pese a exhibir actividad inhibitoria de TNF- α y NF- κ B a 4.88 y 3.64 μ M, esta puede ser atribuida a la toxicidad inherente. Es la primera vez que se evalúa la actividad biológica de un heterocisto glicolípido.

La única característica diferencial entre las parejas de compuestos **28-29** y **33-34**, es el tipo de monosacárido, galactosa y glucosa, los cuales difieren únicamente en la quiralidad de su carbono 4'. Este pequeño cambio repercute significativamente en la actividad biológica; mientras que los glicolípidos **28** y **29** son inócuos, no observándose citotoxicidad ni actividad inhibitoria aparente tanto sobre TNF- α como NF- κ B, los metabolitos **33** y **34** presentan actividad sobre TNF- α y NF- κ B. Sin embargo, podría estar asociada a la citotoxicidad.

Los digalactosilglicerolípidos **30** y **31**, manifestaron valores de viabilidad apropiados. Los valores de IC₅₀ se encontraban a concentraciones entre seis y diez veces más bajas que la correspondiente CC₅₀, demostrando selectividad sobre las dianas investigadas.

Con estos resultados, **30** y **31** serían los únicos glicolípidos que mostrarían un perfil adecuado para continuar siendo investigados en posteriores estudios de relación estructura-actividad.

2.4 CONCLUSIONES

Después de analizar fitoquímicamente el extracto orgánico EO-218, se han extraído las siguientes conclusiones:

- El principal componente activo de la cianobacteria *Dolichospermum* sp. (GTBC-218) es el 1-(4,6-dipentil-5,6-dihidro-2H-1,2,3-oxadiazin-2-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (**24**), y se trata de un nuevo cabeza de serie.

- Se han preparado derivados hemisintéticos **26** y **27**, a partir del producto natural **24**. El derivado acetilado **27** mejora, significativamente, la actividad *in vitro* de **24** en células tumorales HT-29, actividades anti-VIH, anti-oxidante y anti-inflamatoria.

- Todas las moléculas, naturales y hemisintéticas, tienen un perfil de viabilidad celular adecuado en ensayos *in vitro*.

- El metabolito secundario **24** ha sido probado en modelo animal, exhibiendo un perfil de toxicidad prometedor para seguir investigándose.

- Se han aislado los metabolitos, previamente conocidos, feofitina A (**22**) y 13²-hidroxi-feofitina A (**23**); esta última, mostró actividad regenerativa celular, la cual se atribuye a su carácter más hidrofílico.

- Se han aislado los glicolípidos, anteriormente conocidos: 3- β -D-galactosil-1,2-diacyl-sn-glicerol (**28-29**), 3-[α -D-galactosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactosil]-1,2-diacyl-sn-glicerol (**30-31**),

(3R,25R)-3,25-Dihidroxiilbeacosil α -D-glucopiranosido (**32**) y 3- β -D-glucosyl-1,2-diacyl-sn-glicerol (**33-34**).

- Las pruebas de viabilidad han mostrado que tanto el HG (**32**) como la pareja de MGlcDG (**33-34**), son citotóxicos sobre células THP-1.

- Esta es la primera vez que se ha estudiado la actividad biológica del (3R,25R)-3,25-Dihidroxiilbeacosil α -D-glucopiranosido (**32**).

- La mezcla de MGDG (**28-29**) no ha mostrado citotoxicidad ni actividad, frente a TNF- α y NF- κ B.

- Finalmente, la mezcla DGDG (**30-31**) ha ofrecido una concentración de viabilidad adecuada, así como, IC₅₀ frente a TNF- α y NF- κ B de 5.81 μ M y 3.64 μ M, respectivamente.

2.5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.5.1 TÉCNICAS GENERALES QUÍMICAS

Cromatografía en capa fina

El estudio mediante cromatografía en capa fina, se ha efectuado con cromatofolios de aluminio con gel de sílice (Merck-60 230-400 mesh) de 0.2 mm de espesor. Para la visualización de los cromatogramas se utilizó luz ultravioleta (254 nm) y ácido fosfomolibdico.

Cromatografía en columna

Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice (Merck, 230-400 mesh ASTM). El eluyente se indica en cada caso, así como las proporciones relativas de disolvente volumen/volumen.

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases se realizó en un cromatógrafo Bruker EVOQ_GCTQ PREM EI&CI 436GC, con automuestreador COMBI-PAL; la detección se realizó mediante EI-MS y una columna Rxi-55SilMS 30m x 0,25mm ID x 0,25 μ m.

Espectrometría de resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance DRX 500 operando a 500 MHz (H^1) o 125 MHz (C^{13}) y un Bruker Avance AV-I operando a 300 MHz (H^1) o 75 MHz (C^{13}). Los desplazamientos químicos (δ) están indicados en ppm relativas a las señales residuales de disolvente deuterado: δ_H 7.26 y δ_C 77.2 para $CDCl_3$, δ_H 3.31 y δ_C 49.0 para $MeOD-d_4$, δ_H 2.50 y δ_C 39.5 para $DMSO-d_6$. Los espectros de RMN C^{13} fueron adquiridos en un sistema de banda ancha desacoplado de protón. Las siguientes abreviaturas fueron utilizadas para describir los patrones de los picos: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuartete), quint (quintete), sext (sextuplete), sept (septuplete), m (multiplete) y br (señal ancha).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se registró en un espectrómetro QSTAR XL de cuadrupolo con TOF, utilizando técnicas de impacto electrónico (EI+), a 70 e. V., y electrospray (ESI+).

Espectroscopia infrarroja

Los espectros de infrarrojo fueron llevados a cabo con un equipo Agilent Cary 630 FTIR.

Puntos de fusión

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos.

Rotaciones específicas

Los valores de rotación óptica ($[\alpha]_D$) se han medido a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin-Elmer 241C. En cada caso, se indica el disolvente y la concentración (mg/mL) utilizados.

Disolventes y reactivos

Los disolventes y reactivos utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales y utilizados sin previa purificación.

2.5.2 TÉCNICAS GENERALES BIOLÓGICAS

2.5.2.1 Ensayos in vitro

Sensibilidad de levaduras

Los resultados se evaluaron tras 24 horas de incubación a 35°C y lectura de la absorbancia a 530 nm. Se determinó la CMI como aquella concentración de antifúngico o compuesto que inhibe el crecimiento un 50%, comparado con el medio de cultivo sin compuesto. Como antifúngico control se utilizó el fluconazol.

Sensibilidad de hongos filamentosos

En el caso de los hongos filamentosos, las placas se inocularon con una suspensión de esporas a $1-5 \times 10^5$ cls/mL. Las placas se incubaron a 35°C, y la CMI se interpretó después de 48 horas. La CMI se definió como un 100% de inhibición. Se utilizaron como antifúngicos de control, anfotericina B y voriconazol.

Ensayo de actividad antitumoral

Las células cancerosas se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (4,5g/l), L-glutamina, L-piruvato y suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (FBS) en un incubador a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%. Se dejaron crecer las líneas hasta observar un 80% de confluencia

de las monocapas celulares, momento en el que se tripsinizaron empleando una solución de tripsina-AEDT, previo lavado de las monocapas celulares con una solución salina balanceada de fosfatos (PBS). Se sembraron 10.000 células por pocillo, en 4 placas de 24 pocillos, que se dejaron crecer 24 horas antes de administrar los distintos tratamientos. Como tiempo 0 del experimento, se utilizó una de estas placas a la que no se le administra ningún tratamiento. En las placas restantes, se pusieron los distintos ensayos a las concentraciones de elección, además de utilizar un control negativo con células sin tratar. También, en cada experimento se utilizó un control del disolvente, en este caso DMSO al 0,5% (concentración máxima utilizada en la disolución de los extractos en el cultivo y no tóxica para las células) y un blanco que consiste en medio de cultivo sin células al que se le añade el compuesto a la máxima concentración. Todas las muestras se realizaron por triplicado en cada placa. Las placas se dejaron incubando durante 24, 48 y 72 horas. A cada tiempo, se añadieron 110 µl de MTT (preparado en PBS a 5 mg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se retiró el medio y los cristales se solubilizaron en 500µl de DMSO, que se dejaron en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias se determinaron a 570 nm utilizando un lector de microplacas UltraEvolution (TecanR).

Ensayo de actividad anti-VIH

La titulación de los stocks virales, previamente obtenidos, se realizó en función de las unidades de luminiscencia o RLUs obtenidas tras la replicación de los virus recombinantes. Para ello, se sembraron en placas de 96 pocillos 100.000 células diana (MT-2 o PBCMs) por pocillo, que se infectaron con diluciones seriadas de sobrenadante viral hasta un volumen final de 200 µL/pocillo. Se incubó el cultivo a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂, durante 24 o 48 horas. Pasado este tiempo se recogieron las células y se lisaron con 100 µL de solución comercial “Luciferase assay system” o “Renilla assay system” (Promega). La actividad luminométrica o RLUs en los lisados se midió mediante la adición del sustrato luciferasa o renilla en un luminómetro de placa Sirius (Berthold Detection Systems) durante 20 segundos. De esta manera, se obtuvo un valor de “unidades relativas de luciferasa” (RLU) por cada µL de sobrenadante viral.

El ensayo de virus recombinantes se realizó infectando células MT-2 o PBMCs activados con PHA/IL-2 con los sobrenadantes virales previamente obtenidos. Para ello, se sembraron 10⁶ células MT-2/pocillo en placas de 96. Se trató el cultivo con diluciones seriadas en base 2. Después de media hora de incubación, se infectó el cultivo con el virus recombinante portador del gen renilla a un título de infección que proporcionaba 10⁵ unidades de luminiscencia/pocillo (RLU/pocillo). El volumen final de cada pocillo fue de 200 µL. La actividad anti-VIH fue determinada a las 48 horas midiendo la actividad luciferasa-renilla igual que en el apartado anterior. Las RLUs son directamente proporcionales al grado de replicación viral.

Todos los ensayos de evaluación de la actividad anti-VIH fueron llevados en paralelo para determinar la viabilidad celular del cultivo, en presencia o no, de las diferentes concentraciones de las moléculas aisladas. Para ello, se siguió exactamente la misma metodología que en el ensayo anti-VIH, excepto que no se añadió sobrenadante viral sino

medio DMEM completo en la misma proporción, y la detección de la viabilidad se llevó a cabo con el kit de detección de viabilidad CellTiter Glo (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La viabilidad fue directamente proporcional a la actividad luciferasa obtenida. Todos los datos se expresaron en porcentaje respecto a un control con DMSO a la misma concentración

La transcripción viral se evaluó mediante transfección de un plásmido luciferasa bajo el control del genoma viral completo del VIH (NL4.3-Luc) en MT-2. Para ello, 25×10^6 MT-2 por cubeta fueron resuspendidas en 350 μ L de RPMI sin antibiótico, ni glutamina, ni suero. Se añadió a la cubeta de electroporación 1 μ g de plásmido por cada 10^6 de células y se agitó suavemente para mezclar el ADN con las células. Se mantuvo la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente y se electroporó con un electroporador Easyject plus (Equibio: 1 pulso a 280 v, 1500 μ F, R infinita). Se llevaron las células, inmediatamente, a RPMI completo (10^6 / mL) y se trató con diferentes concentraciones de la molécula objeto de estudio. A las 48 horas se midió la actividad luciferasa.

La evaluación de la acción sobre el ciclo celular se ha realizado en PBMCs humanos, tanto activados como en reposo. Para ello, se utilizó un protocolo basado en ioduro de propidio (IP). Se cultivaron 1×10^6 PBMCs sin estímulos durante, al menos, 24 horas o PBMCs activados (PHA + IL-2) durante, al menos, 48 horas tratando con la molécula de interés durante 2 o 24 horas a tres concentraciones diferentes (100, 500 y 1000 nM). Pasado ese tiempo, se centrifuga y se resuspendió el cultivo en EtOH al 70% a -20°C para permeabilizar las células. Se incubó durante 30 minutos a 4°C y, posteriormente, se lavó con PBS 2 veces. Se trató con RNAsa a 0,5 mg/ml y se incubó, de nuevo, 30 minutos a 37°C agitando de vez en cuando. Se lavó, de nuevo, el cultivo con PBS y se resuspendió en el mismo PBS, añadiendo 100 μ L de Ioduro de propidio, por tubo, a 1 mg/ml. Se analizó el ciclo celular seleccionando la población de linfocitos en el clitómetro, utilizando el vehículo DMSO como control.

Los receptores seleccionados para evaluar la activación de las células T fueron CD25, CD69 y HLADR. CD69 se expresaron en células T y en NKs y en un marcador temprano de activación. CD25, es la subunidad alfa del receptor de IL-2 sobre-expresado en células T activadas. Mientras que HLA-DR es un HLA-2 también sobre-expresado en células T activadas. Para evaluar su expresión se utilizaron PBMCs en reposo, tratados con la muestra durante 2 o 24 horas a 2 concentraciones diferentes (500 y 2500 nM). Se utilizó DMSO como control de expresión. Tras el tratamiento, se recogió el cultivo y se lavó con PBS. Posteriormente, se realizó el marcaje con anticuerpos anti CD25 (FITC), CD69 (PE) o HLA-DR (FITC) y se analizó su expresión por citometría. Los resultados se mostraron como porcentaje de expresión seleccionando la población correspondiente a los linfocitos.

Ensayo de actividad citotóxica en THP-1

Las células THP-1 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo e incubadas, durante una noche, en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 . Posteriormente, las células fueron tratadas con los compuestos ensayados a la concentración indicada y con DMSO como control negativo durante 72 h.

Ensayo MTT en THP-1

Una disolución de MTT (50 μ L, 7 mg/mL en PBS) fue añadida a cada pocillo y se incubaron las placas durante 2 h adicionales. Después, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 100 μ L de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazan. La absorbancia fue medida a 590 nm, utilizando un lector de placas espectrofotométrico ELISA (SpectraMax® i3, Molecular Devices, CA, USA). Las muestras fueron consideradas no tóxicas cuando la viabilidad celular para las células de THP-1 era $\geq 90\%$.

Ensayo de inhibición de TNF- α

Las células THP-1 (5x10⁴ células/pocillo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas durante 12 h. Las células fueron después pretratadas con varias concentraciones de los compuestos durante 2 h., antes de estimularlas con LPS (10 ng/mL) durante 12 h. Los sobrenadantes fueron posteriormente recogidos y la expresión de TNF- α fue medida utilizando un kit de ensayo de enzima-inmunoabsorbente (ELISA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Diacclone Company, Besancon, France). La absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas espectrofotométrico ELISA (Anthos 2020, Version 2.0.5, Biochrom Ltd., UK). El porcentaje de inhibición TNF- α fue calculado de la relación entre la cantidad de TNF- α segregada por las células tratadas (μ M) y la línea base de secreción de TNF- α (pg/mL). La dexametasona (Sigma Aldrich; 50-02-2) fue utilizada como control positivo (1 μ g/mL). Los resultados fueron normalizados con el DMSO como control negativo.

Ensayo de inhibición de NF- κ B

Las células THP-1 fueron transfectadas, utilizando lipofectamina y un reactivo de transfección (Thermo Fisher Scientific, Spain), con 0.3 μ g de gen transportador de plásmido NF- κ B promovido por luciferasa (pGL2-NF- κ B-Luc) (Promega, USA) y 0.03 μ g de transportador de plásmido Renilla (pTK-Renilla). Después de 1 día, las células fueron incubadas con LPS (1 μ g/mL), en ausencia o presencia de los compuestos ensayados, a diferentes concentraciones durante 12 h. Finalmente, la actividad luciferasa fue medida con un kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Ensayo de actividad regenerativa

Las células HaCaT-Nuclight-Red fueron sembradas a una densidad de 5x10³ células/pocillo en 96 pocillos a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. Posteriormente, los cultivos celulares fueron tratados con las sustancias ensayadas en medio DMEM libre de SBF o con un 10% de SBF como control positivo; las placas fueron introducidas en un microscopio IncuCyte ZOOM live cell (Essen Bioscience) y las imágenes fueron tomadas durante 48 h. Los datos fueron analizados mediante la intensidad total integrada (RCUx μ m²xpocillo) del contenido vivo celular. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.5.2.2 Ensayos *in vivo*

Ensayos en ratones

La muestra ensayada fue disuelta en una mezcla 42% EtOH/58% H₂O. Los 127 mg de extracto fueron resuspendidos en 9071 µL de disolvente, para una concentración final de 14µg/µL. Una muestra de 45 ratones fue randomizada en cuatro grupos. Cada grupo estaba formado, aproximadamente, por un 50% de machos y un 50% de hembras.

- Grupo 1: 700 µg por inyección.
- Grupo 2: 100 µg por inyección.
- Grupo 3: 50 µg por inyección.
- Grupo 4: solvente control por inyección.

Los ratones fueron inyectados tres veces por semana con 50 µL de disolvente o de disolución, con el metabolito objeto de estudio de manera intraperitoneal.

Aquellos ratones, que fueron encontrados muertos, no fueron analizados post mortem ni su tejido fue analizado. El estudio hematológico se realizó utilizando el analizador Abacus Junior Vet. Se realizó un seguimiento de células rojas y células blancas. Las necropsias fueron realizadas mediante análisis macroscópico de los organismos, como a nivel microscópico de los diferentes tejidos.

2.5.3 COLECCIÓN DE MUESTRA Y CULTIVO

Dolichospermum sp. (GTBC-218) fue recolectada en el océano Atlántico, Islas Canarias, y crecida en condiciones axénicas en Valoralia I más D. Las cianobacterias fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer de 2 L. de capacidad con medio de cultivo BG-110. Los cultivos fueron crecidos con burbujeo continuo de aire e incubados a 23 ± 1°C. El cultivo fue exclusivamente iluminado con luz ambiental. La recolección de biomasa se realizó cada 21 días, la biomasa obtenida fue centrifugada y posteriormente liofilizada.

2.5.4 EXTRACCIÓN, FRACCIONAMIENTO Y AISLAMIENTO.

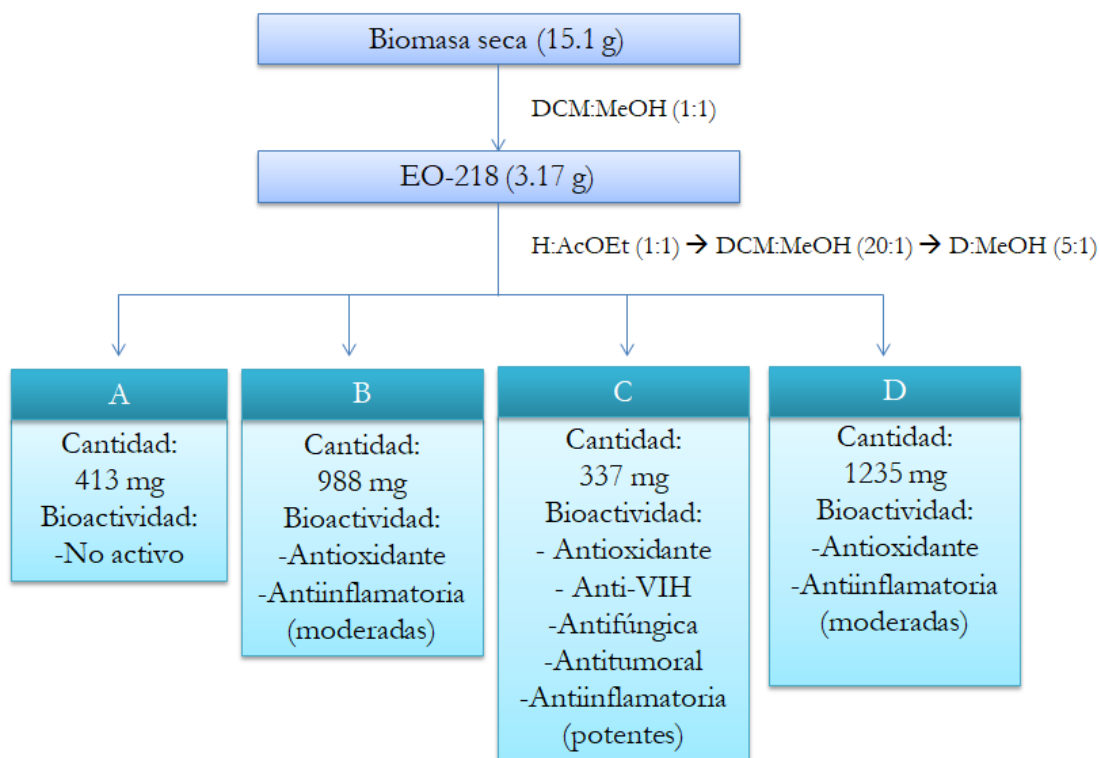
2.5.4.1 Fraccionamiento inicial

La biomasa seca liofilizada (15.1 g.) fue extraída mediante agitación a temperatura ambiente con una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂-MeOH (3x 1L) y, posteriormente, con MeOH (3 x 500 mL). Los extractos fueron concentrados mediante evaporación, a presión reducida, para obtener un aceite gomoso de color verde (3,169 g.), conduciendo al extracto EO-218 B.

El fraccionamiento inicial se realizó mediante cromatografía en columna con gel de sílice, utilizando como fase móvil un gradiente que comenzó con una mezcla Hept-AcOEt (1:1), CH₂Cl₂-MeOH (20:1) y se finalizó con CH₂Cl₂-MeOH (5:1). Se obtuvieron 4 fracciones A-D que fueron sometidas a los diferentes bioensayos, cuyos resultados se muestran a continuación:

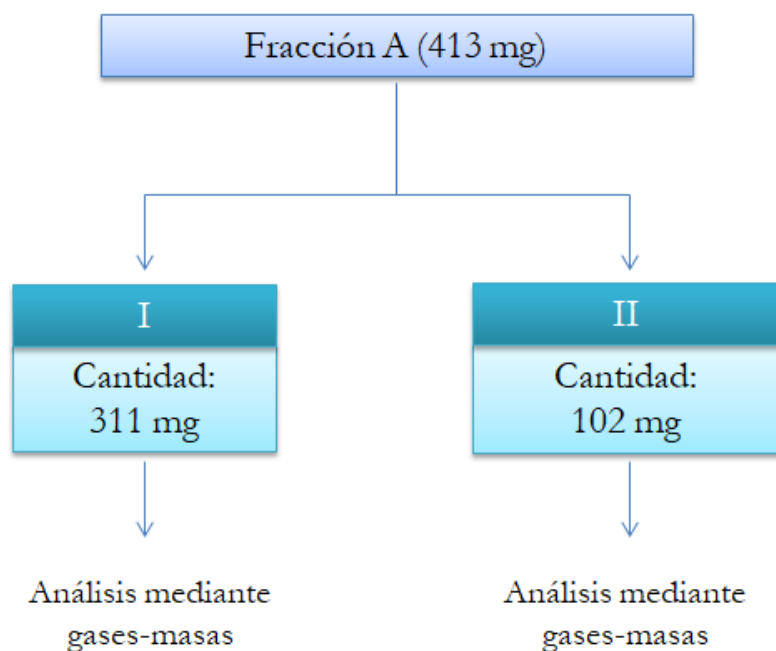
| Fracción | Antifúngica | AntiVIH | Antitumoral | Antioxidante | Antiinflamatoria | Regenerativa |
|----------|-------------|---------|-------------|--------------|------------------|--------------|
| A | | | | | | |
| B | | | | | | |
| C | | | | | | |
| D | | | | | | |

| | | | | | |
|-----------|--|--------------------|--|----------------|--|
| No activo | | Actividad moderada | | Actividad alta | |
|-----------|--|--------------------|--|----------------|--|



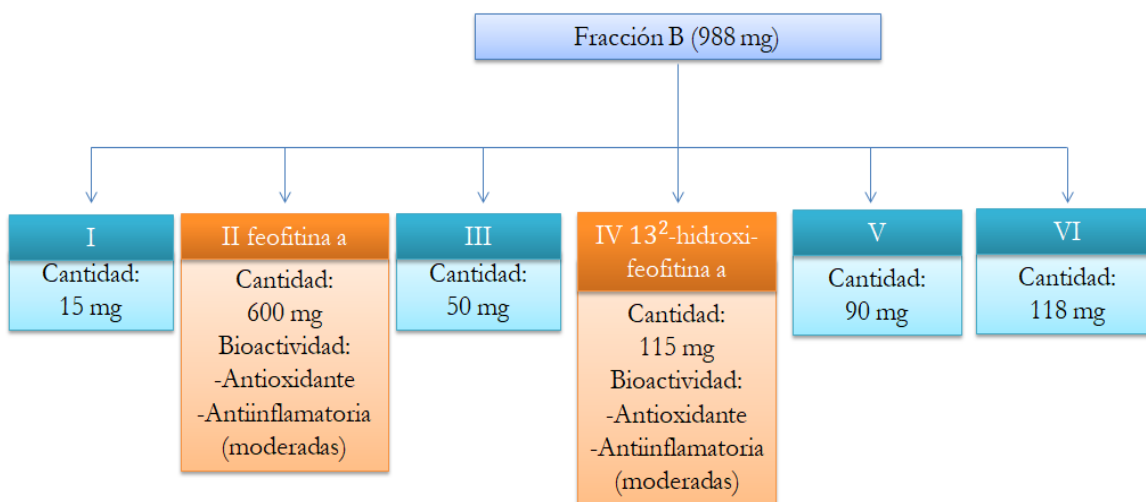
2.5.4.2 Fraccionamiento de A

La fracción A (413 mg) fue sometida a una separación mediante cromatografía en columna de sílica gel, utilizando como eluyentes Hept:AcOEt (5:1), obteniéndose dos nuevas fracciones: A-I (311 mg) y A-II (102 mg) que, posteriormente, fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a masas GS/MS.



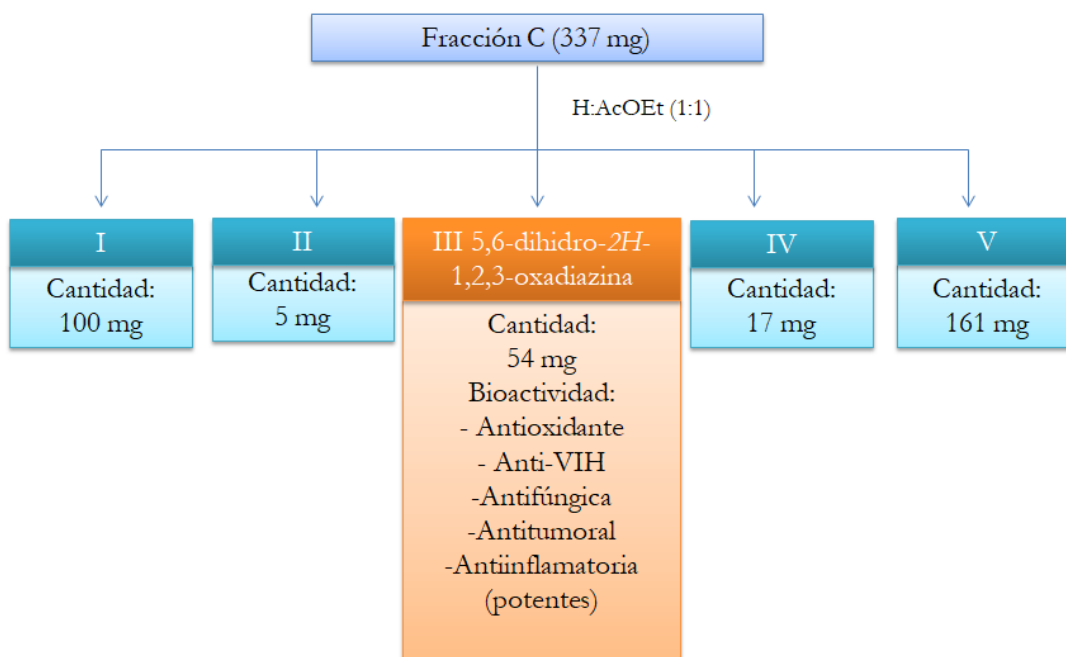
2.5.4.3 Fraccionamiento de B

La fracción B (988 mg) fue separada mediante cromatografía en columna de sílica gel en seis fracciones (I-VI), utilizando como fase móvil Hept-AcOEt (1:1). De la fracción B-II se aisló la *feofitina A* (600 mg) y de la fracción B-IV se aisló la *13²-hidroxi-feofitina A* (115 mg); ambos se obtuvieron puros.



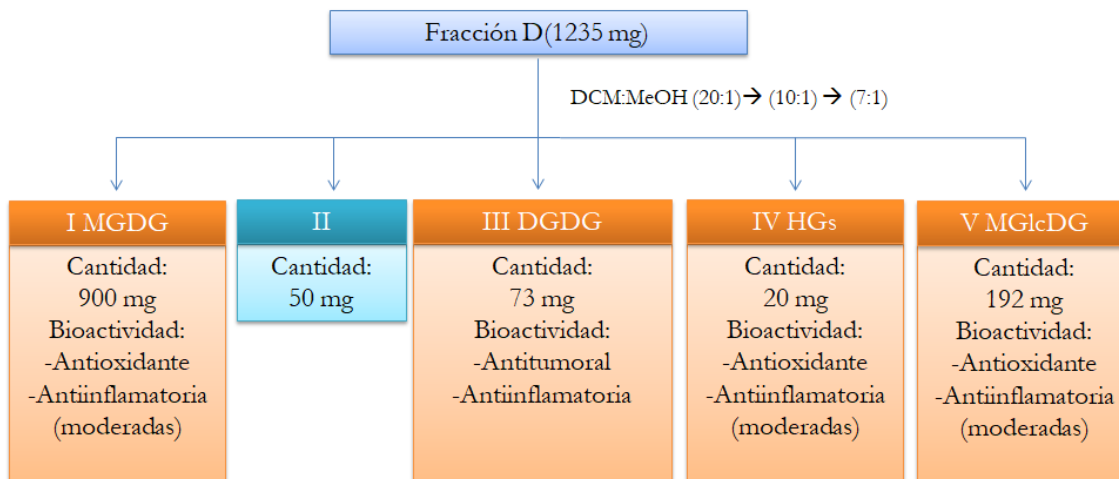
2.5.4.4 Fraccionamiento de C

La fracción C (337 mg) se separó mediante cromatografía en columna de sílica gel en 5 fracciones (I-V), utilizando como fase móvil Hept:AcOEt (1:1). De la fracción C-III se aisló puro el metabolito *5,6-dihidro-2H-1,2,3-oxadiazina* (54 mg), que ha resultado ser el que mayor actividad biológica ha mostrado de todo el extracto.



2.5.4.5 Fraccionamiento de D

La fracción d (1235 mg) fue sometida a cromatografía en columna utilizando un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (20:1) \rightarrow (10:1) \rightarrow (7:1). Se obtuvieron 5 fracciones (I-V), de las cuales, se han aislado una serie de glicolípidos. De la fracción D-I se obtuvieron los MGDG (**28-29**, 900 mg); de la fracción D-III se obtuvieron los DGDG (**30-31**, 73 mg); de la fracción D-IV se aisló el HG puro (**32**, 20 mg) y de la fracción D-V se aislaron los MGlcDG (**33-34**, 192 mg).



2.5.5 ANÁLISIS DE GC-MS

El método utilizado para el estudio de la fracción A-I y A-II se ha llevado a cabo utilizando un flujo de 1 mL/min de N₂ y con la siguiente rampa de temperatura:

| Temperatura °C | Velocidad (°C/min) | Estabilizado (min) | Total (min) |
|----------------|--------------------|--------------------|-------------|
| 80.0 | 0.0 | 1.00 | 1.00 |
| 150.0 | 10.0 | 0.00 | 8.00 |
| 155.0 | 1.0 | 5.00 | 18.00 |
| 160.0 | 5.0 | 4.00 | 23.00 |
| 300.0 | 10.0 | 5.00 | 42.00 |

Cromatogramas de gases correspondientes a las fracciones A-I y A-II:

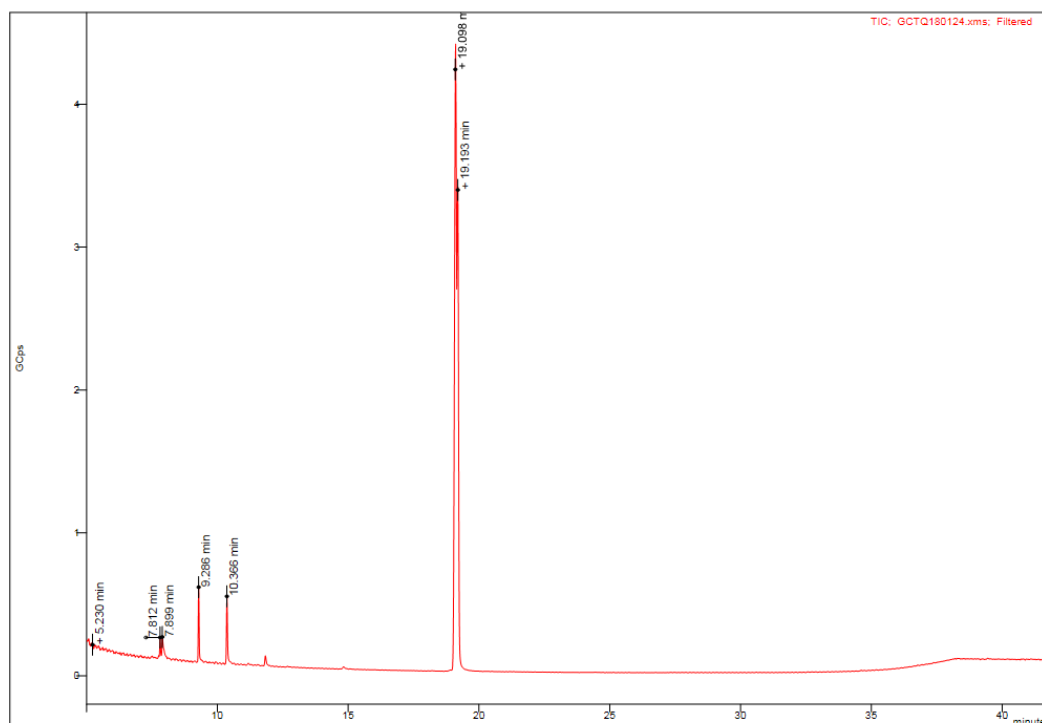


Figura 32. Cromatograma de gases de la fracción EO-218 A-I.

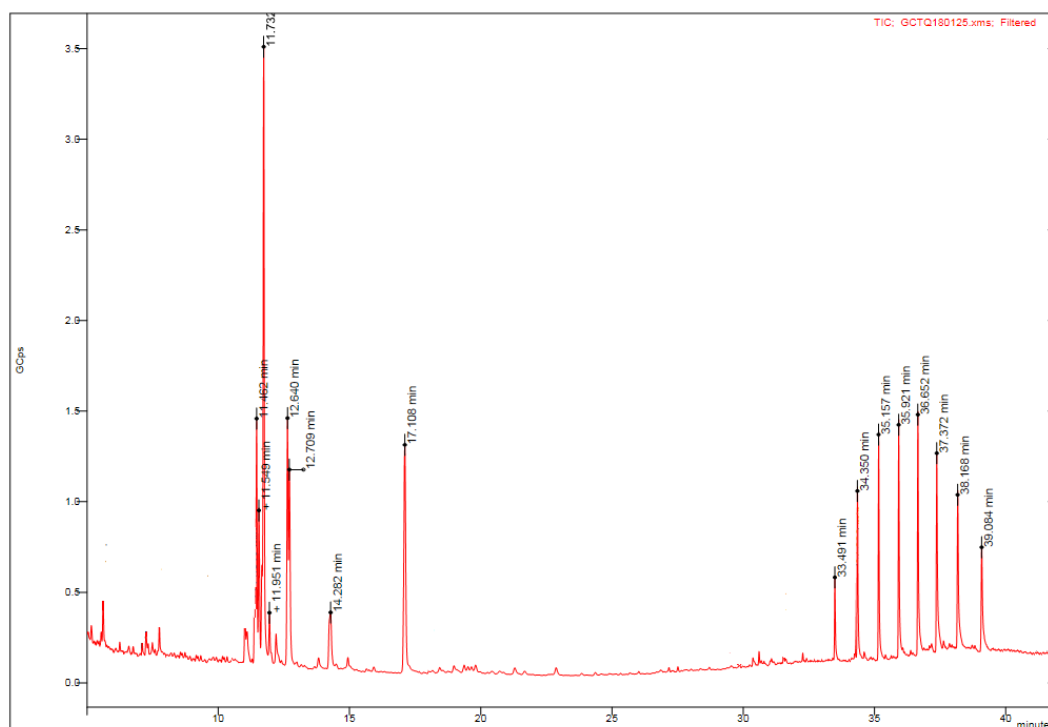
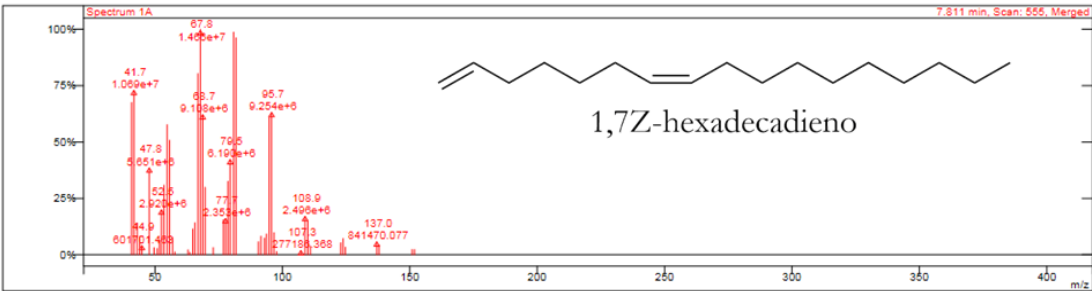
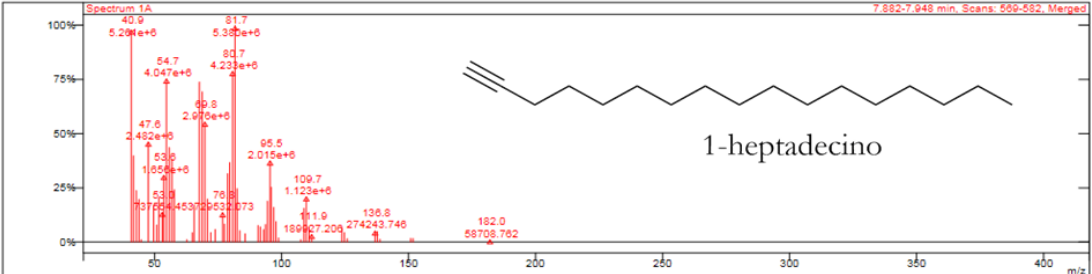
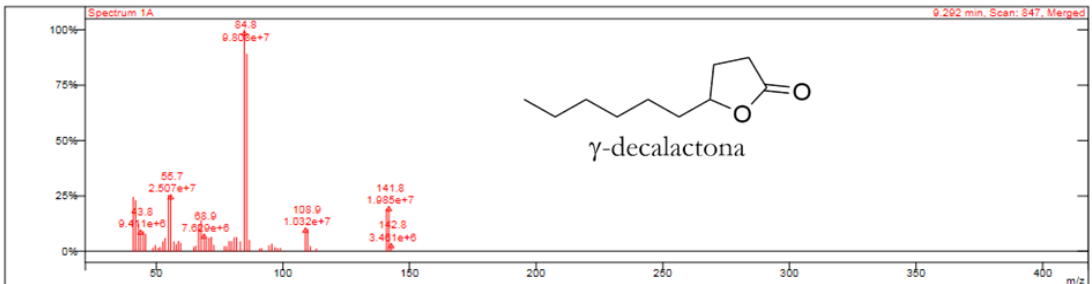
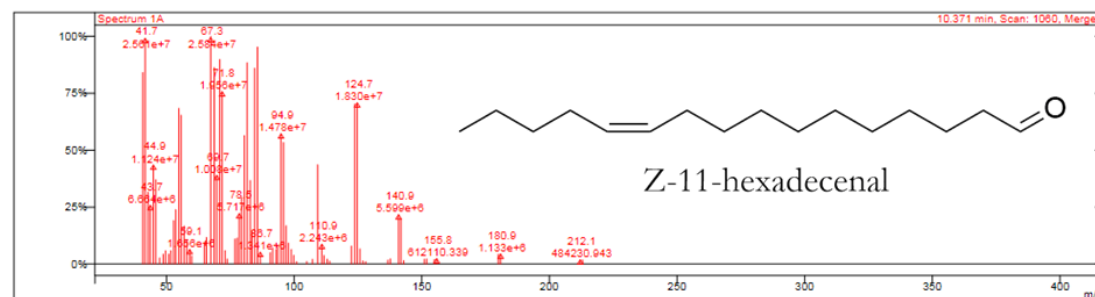


Figura 33. Cromatograma de gases de la fracción EO-218 A-II.

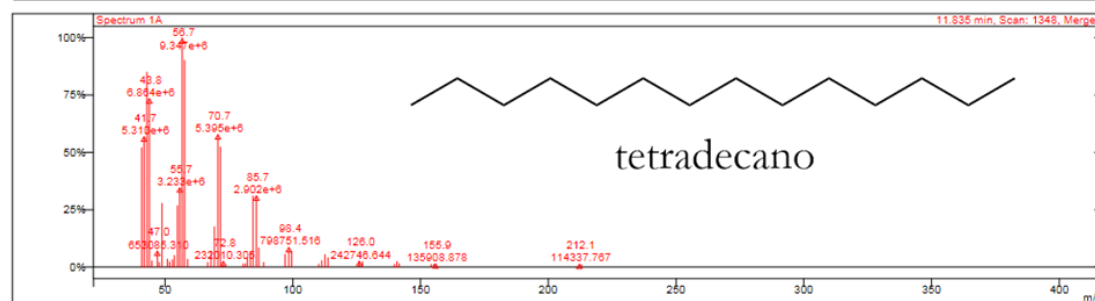
2.5.6 ASIGNACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS NATURALES POR GC/MS.

| Nº | Tiempo de retención | Espectro de masas |
|----|-------------------------|---|
| 1 | $t_R = 7.81\text{min}$ |  <p>1,7Z-hexadecadieno</p> |
| 2 | $t_R = 7.90\text{ min}$ |  <p>1-heptadecino</p> |
| 3 | $t_R = 9.29\text{ min}$ |  <p>γ-decalactona</p> |

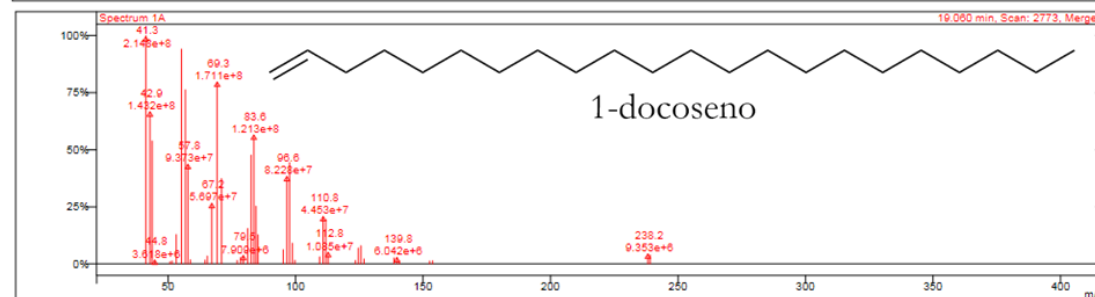
4 $t_R = 10.37$ min



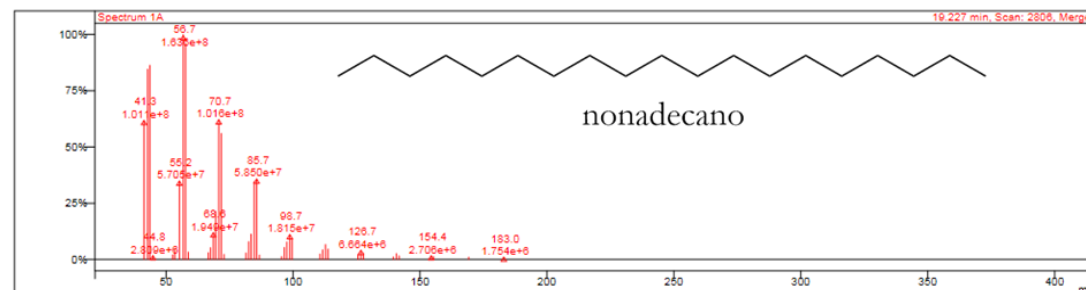
5 $t_R = 11.38$ min



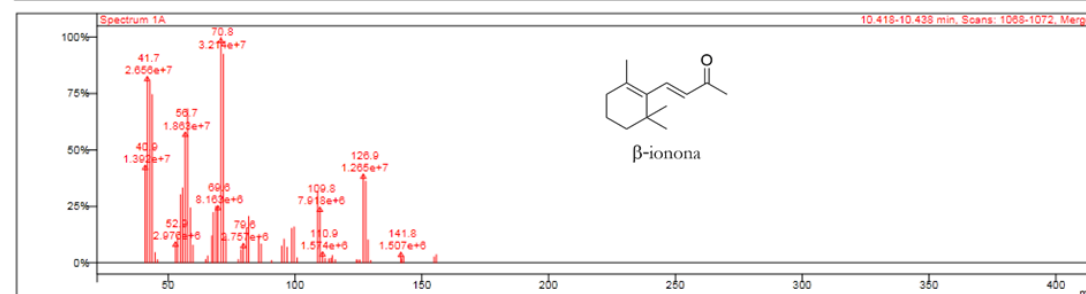
6 $t_R = 19.06$ min



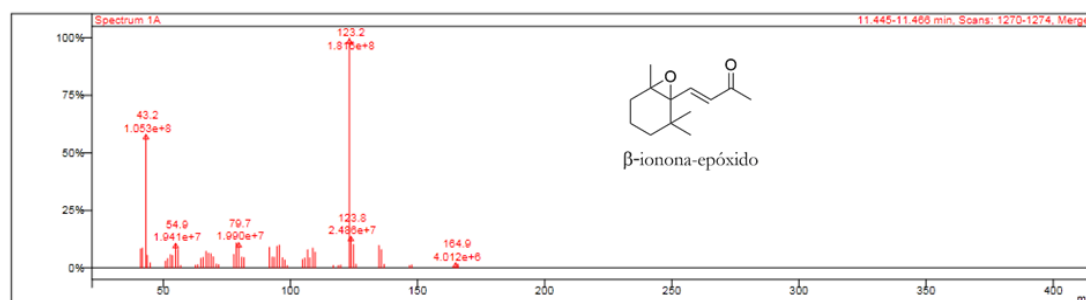
7 $t_R = 19.22$ min



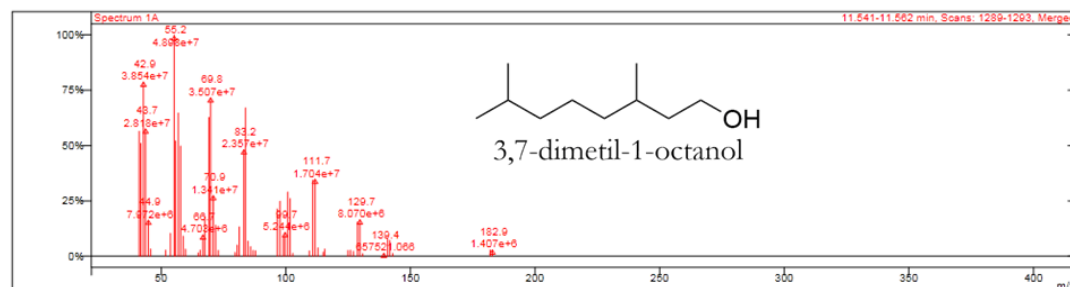
8 $t_R = 10.41$ min



9 $t_R = 11.44$ min



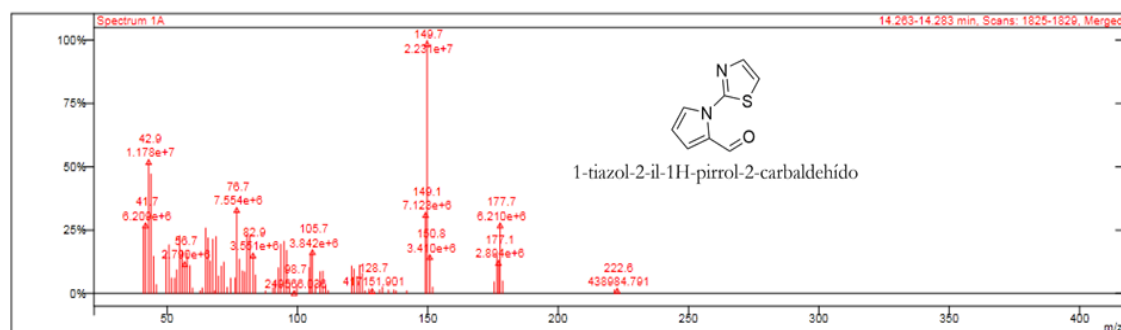
10 $t_R = 11.55$ min



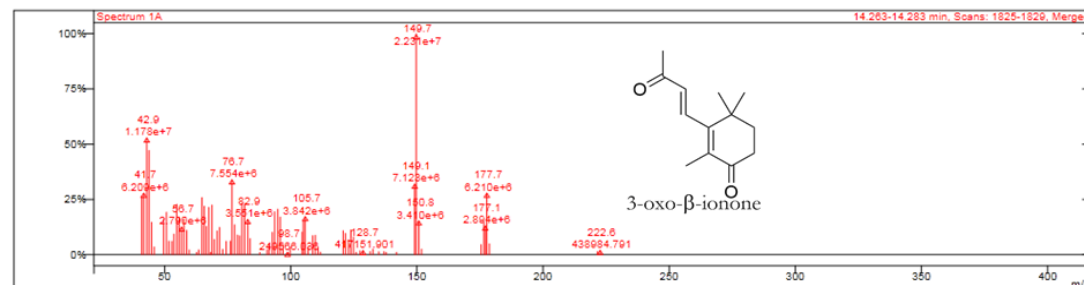
11 $t_R = 11.72$ min



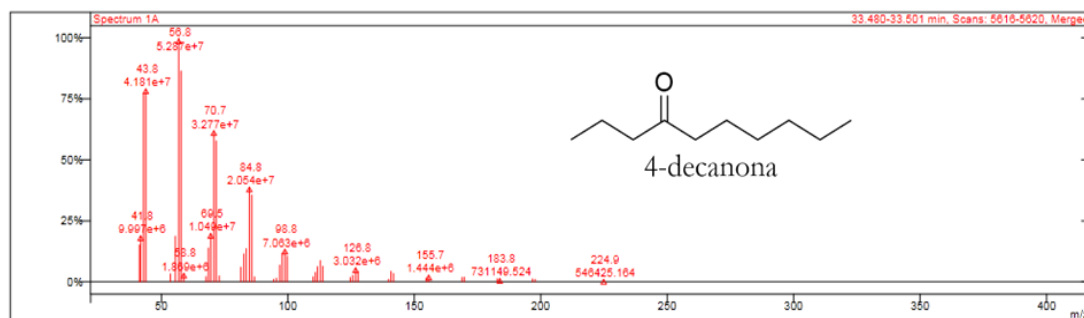
12 $t_R = 14.26$ min



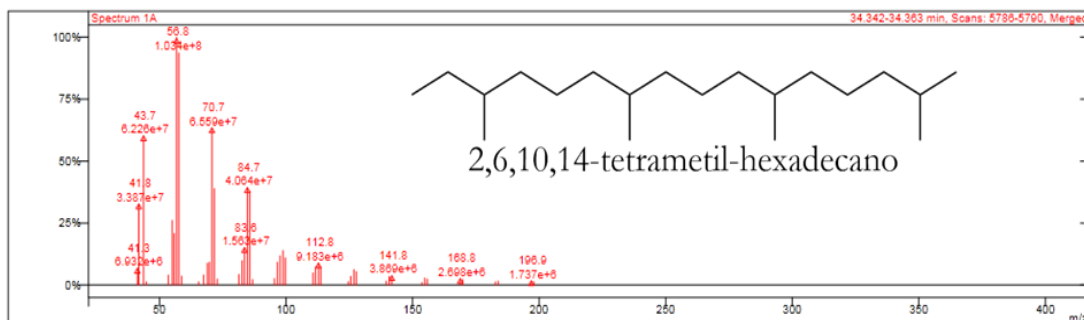
13 $t_R = 17,11$ min



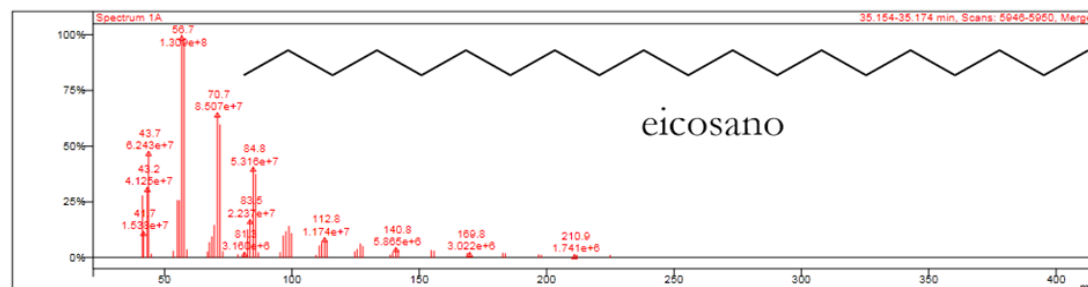
14 $t_R = 33,48$ min



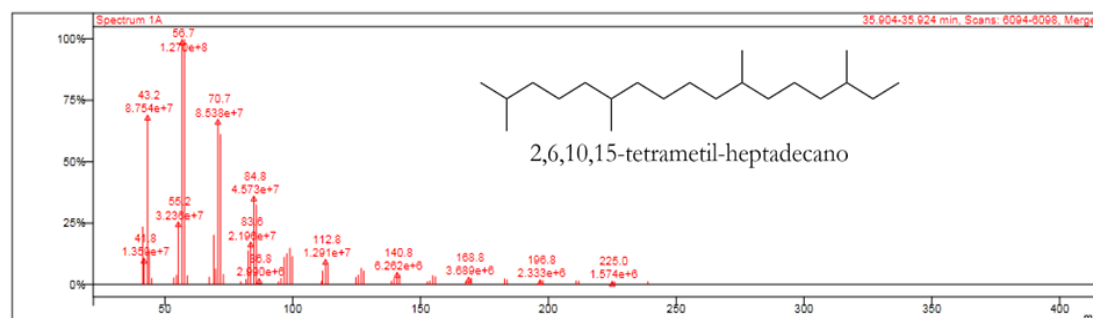
15 $t_R = 34,38$ min



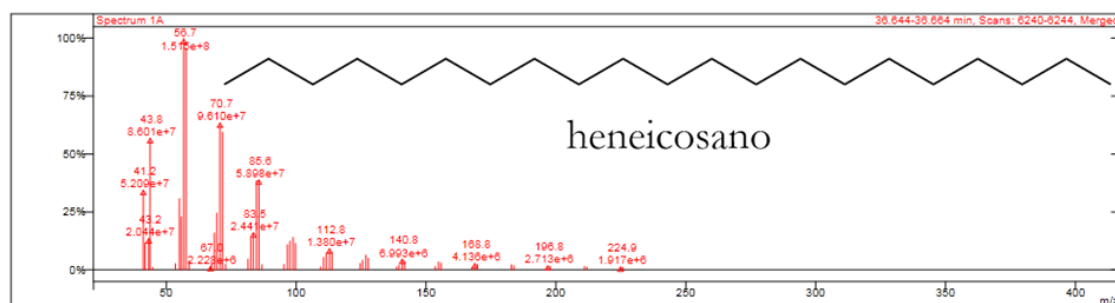
16 $t_R = 35,15$ min



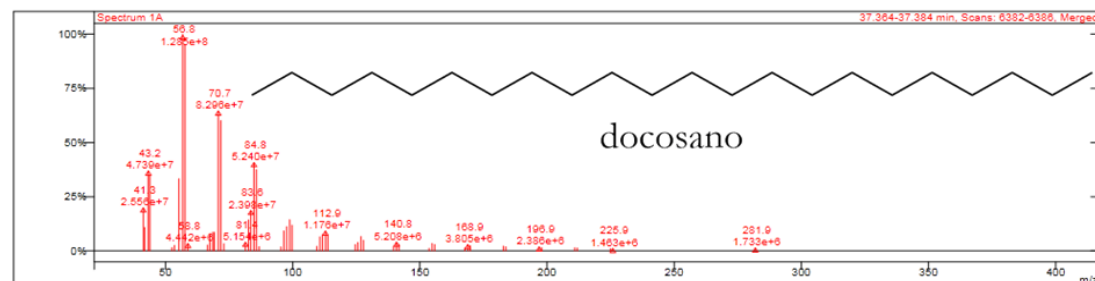
17 $t_R = 35,90$ min



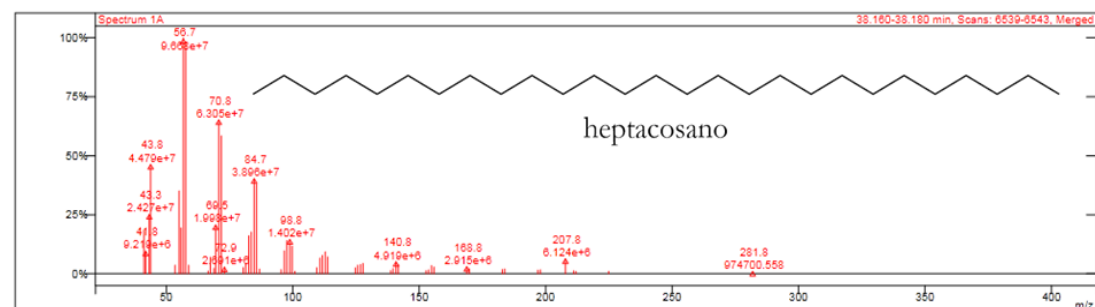
18 $t_R = 36,65$ min



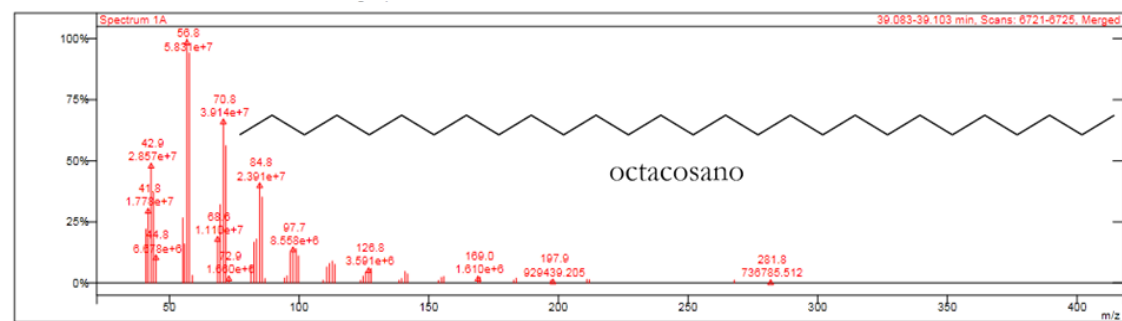
19 $t_R = 37,37$ min

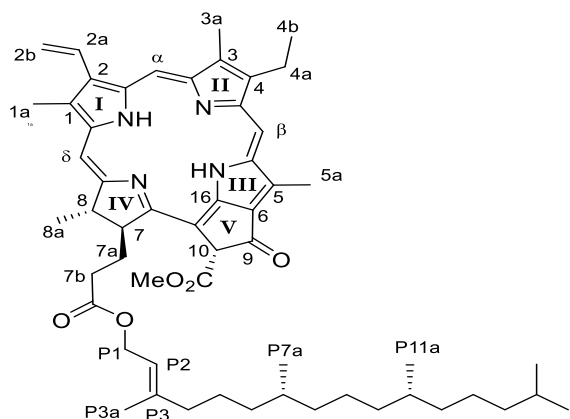


20 $t_R = 38,17$ min



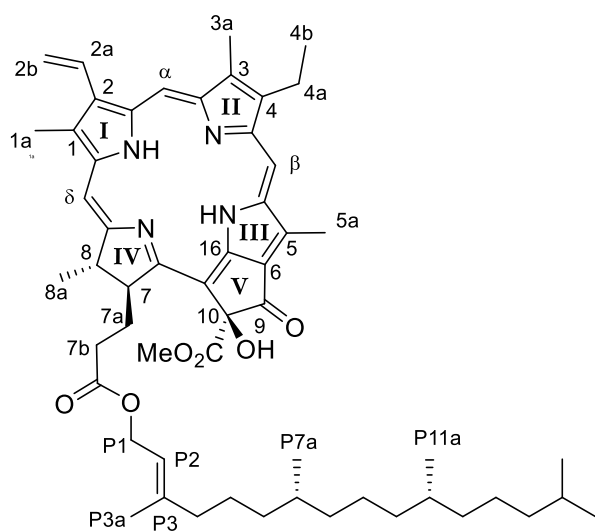
21 $t_R = 39,09$ min



2.5.7. DATOS DE RMN Y HRESIMS*Feofitina A (22)*

RMN- H^1 (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.20 (s, 1H, H- α), 9.38 (s, 1H, H- β), 8.56 (s, 1H, H- γ), 7.87 (dd, 1H, J = 17.7; 11.6 Hz, H2a), 6.31 (s, 1H, H-10), 6.22 (dd, 1H, J = 17.7; 1.2 Hz, H-2b'), 6.12 (dd, 1H, J = 11.6 Hz, H2b''), 5.19 (m, 1H, H-P2), 4.56 (m, 1H, H-P1'), 4.48 (m, 1H, H-8), 4.48 (m, 1H, H-P1''), 4.25 (m, 1H, H-7), 3.88 (3H, s, H-10b), 3.67 (s, 3H, H-5a), 3.52 (2H, q, J = 7.5 Hz, H-4a), 3.36 (s, 3H, H-1a), 3.08 (s, 3H, H-3a), 2.68 (m, 1H,

H-7a'), 2.54 (m, 1H, H-7b'), 2.39 (m, 1H, H-7a''), 2.26 (m, 1H, H-7b''), 1.93 (m, 2H, H-P4), 1.86 (d, 3H, H-8a), 1.64 (t, 3H, J = 7.5 Hz, H-4b), 1.62 (s, 3H, H-P3a), 1.53 (sept, 1H, J = 6.7Hz, H-15), 1.40-0.99 (m, 23H), 0.88 (d, 6H, J = 6.6 Hz, H-P7a/P11a), 0.84 (d, 3H, J = 6.6 Hz, H-P15a), 0.82 (d, 3H, J =6.6 Hz, H-P16), -1.72 (s, 1H, NH). **RMN- C^{13}** (125 MHz, $CDCl_3$): δ 131.9 (C-1), 136.3 (C-2), 136.2 (C-3), 145.2 (C-4), 129.0 (C-5), 129.2 (C-6), 51.32 (C-7), 50.3 (C-8), 189.8 (C-9), 64.9 (C-10), 142.2 (C-11), 136.5 (C-12), 155.7 (C-13), 151.0 (C-14), 138.0 (C-15), 149.8 (C-16), 161.4 (C-17), 172.3 (C-18), 97.5 (C- α), 104.4 (C- β), 106.8 (C- γ), 93.2 (C- δ), 12.2 (C-1a), 129.1 (C-2a), 122.8 (C-2b), 11.26 (C-3a), 19.45 (C-4a), 17.5 (C4-b), 12.2 (C-5a), 31.4 (C-7a), 30.0 (C-7b), 173.0 (C-7c), 23.3 (C-8a), 169.75 (C-10a), 53.0 (C-10b), 61.6 (P-1), 118.1 (P-2), 142.2 (P-3), 16.4 (P-3a), 39.9 (P-4), 25.2 (P-5), 37.4 (P-6), 32.9 (P-7), 19.7 (P-7a), 37.5 (P-8), 24.5 (P-9), 37.46 (C-10), 32.7 (P-11), 19.7 (P-11a), 36.8 (P-12), 24.9 (P-13), 40.0 (P-14), 28.0 (P-15), 22.7 (P-15a), 22.7 (P-16). **HRESIMS** m/z $[M+Na]^+$ 893.5732 (calculado para $C_{55}H_{74}NaN_4O_6$ 893.5729).

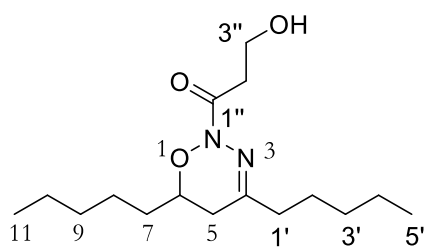
13²-hidroxi-feofitina A (23)

RMN- H^1 (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9.41 (s, 1H, H- α), 9.58 (s, 1H, H- β), 8.64 (s, 1H, H- γ), 7.97 (m, 1H, H-2a), 6.28 (d, 1H, J = 17.8 Hz, H-2b'), 6.18 (d, 1H, J = 11.5 Hz, H-2b''), 5.51 (s, 1H, OH), 5.24 (m, 1H, H-P2), 4.59 (m, 1H, H-P1'), 4.59 (m, 1H, H-8), 4.51 (m, 1H, H-P1''), 4.18 (m, 1H, H-7), 3.74 (s, 3H, H-10b), 3.69 (m, 2H, H-4a), 3.63 (s, 3H, H-5a), 3.42 (3H, s, H-1a), 3.20 (s, 3H, H-3a), 2.96 (m, 1H, H-7a'), 2.57 (m, 1H, H-7a''), 2.33 (m, 2H, H-7b), 1.93 (m, 2H, H-P4), 1.69 (t, 3H, J = 7.5Hz, H-4b), 1.59-0.96 (m, 27H), 0.86 (d, 6H,

J = 6.6 Hz, H-P7a/P11a), 0.82 (d, 3H, J = 6.1 Hz, H-P15a), 0.80 (d, 3H, J = 6.2 Hz, H-P16).

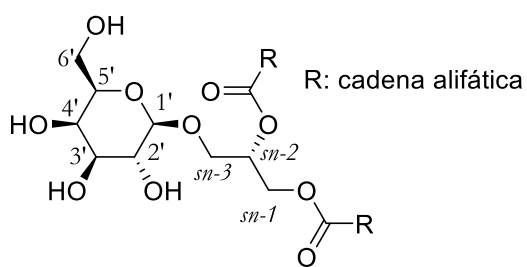
RMN- C^{13} (75 MHz, $CDCl_3$): δ 131.9 (C-1), 136.6 (C-2), 136.3 (C-3), 145.3 (C-4), 129.21 (C-5), 129.9 (C-6), 52.05 (C-7), 50.5 (C-8), 192.1 (C-9), 89.1 (C-10), 142.2 (C-11), 136.4 (C-12), 155.4 (C13), 151.1 (C14), 138.0 (C15), 150.0 (C16), 162.7 (C17), 172.9 (C18), 98.1 (C α), 104.4 (C- β), 107.9 (C- γ), 93.8 (C- δ), 12.2 (C-1a), 129.55 (C-2a), 123.0 (C-2b), 11.36 (C-3a), 19.6 (C-4a), 17.6 (C-4b), 12.2 (C-5a), 31.8 (C-7a), 31.3 (C-7b), 173.7 (C-7c), 22.8 (C-8a), 172.56 (C-10a), 53.5 (C-10b), 61.7 (P-1), 118.3 (P-2), 142.9 (P-3), 16.5 (P-3a), 40.0 (P-4), 25.2 (P-5), 37.4 (P-6), 32.9 (P-7), 19.8 (P-7a), 37.5 (P-8), 24.6 (P-9), 36.8 (P-10), 32.8 (P-11), 19.7 (P-11a), 37.5 (P-12), 24.9 (P-13), 39.5 (P-14), 28.0 (P-15), 22.7 (P-15a), 22.7 (P-16). **HRESIMS** m/z [M+Na] $^+$ 909.5681 (calculado para $C_{55}H_{74}NaN_4O_6$ 886.5695).

1-(4,6-dipentil-5,6-dihidro-2H-1,2,3-oxadiazin-2-il)-3-hidroxipropan-1-ona (24)



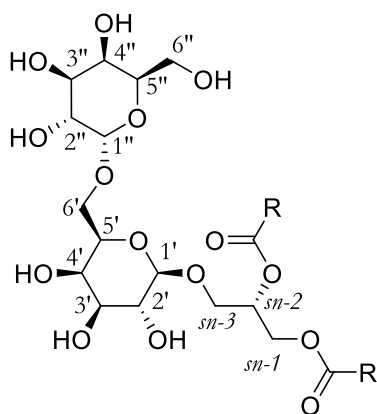
RMN- H^1 (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4.05 (dddd, 1H, J = 3.8, 4.9, 7.8, 8.8 Hz, H-6), 3.91 (t, 2H, J = 5.2 Hz, H-3''), 2.98 (br, 1H, H3''-OH), 2.83 (m, 2H, H-2''), 2.30 (dd, 1H, J = 8.8, 18.1 Hz, H-5a), 2.30 (t, 2H, J = 6.6 Hz, H-1'), 2.21 (dd, 2H, J = 3.8, 18.1 Hz, H-5b), 1.71 (m, 1H, H-7a), 1.56 (m, 2H, H-2'), 1.51 (m, 1H, H-7b), 1.40 (m, 2H, H-8), 1.32 (m, 2H, H-9), 1.32 (m, 2H, H-10), 1.32 (m, 2H, H-3'), 1.32 (m, 2H, H-4'), 0.90 (t, 3H, J = 6.8 Hz, H-5'), 0.89 (t, 3H, J = 6.8 Hz, H-11). **RMN- C^{13}** (75 MHz, $CDCl_3$): δ 167.1 (C-1''), 150.7 (C-4, determinado mediante HMBC), 75.6 (C-6), 58.6 (C-3''), 37.5 (C-1'), 36.1 (C-2''), 34.1 (C-7), 31.8 (C-5), 31.7 (C-9), 31.5 (C-10), 25.7 (C-2'), 24.5 (C-8), 22.6 (C-10), 22.5 (C-4'), 14.1 (C-11), 14.1 (C-5'). **HRESIMS** m/z [M+Na] $^+$ 301.2152 (calculado para $C_{16}H_{30}NaN_2O_3$ 301.2149). **IR** ν_{max} 3410, 2953.3, 2926.3, 2856.0, 1726.9, 1671.6, 1627.7, 1461.8, 1401.1, 1380.9, 1048.4, 998.6, 943.9, 725.3 cm^{-1} . $[\alpha]_D^{25} = -75.0^\circ$ (c = 0.033, MeOH).

3- β -D-galactosil-1,2-diacil-sn-glicerol (28-29)



RMN- H^1 (300 MHz, CD_3OD): δ 5.26 (m, 1H, H $_{sn}$ -2), 4.45 (m, 1H, H $_{sn}$ -1a), 4.23 (m, 1H, H $_{sn}$ -1b), 3.99 (dd, 1H, J = 5.4, 10.8 Hz, H $_{sn}$ -3a), 3.76 (m, 1H, H $_{sn}$ -3b), 4.23 (d, 1H, J = 7.2 Hz, H-1'), 3.51 (m, 1H, H-2'), 3.49 (m, 1H, H-3'), 3.82 (m, 1H, H-4'), 3.47 (m, 1H, H-5'), 3.74 (m, 2H, H-6'). **RMN- C^{13}** (75 MHz, CD_3OD): δ 71.8 (C $_{sn}$ -2), 64.0 (C $_{sn}$ -1), 68.71 (C $_{sn}$ -3), 105.3 (C-1'), 72.4 (C-2'), 74.8 (C-3'), 70.2 (C-4'), 76.7 (C-5'), 62.5 (C-6'). $[\alpha]_D^{20} = +15.1^\circ$ (c = 0.20, MeOH).

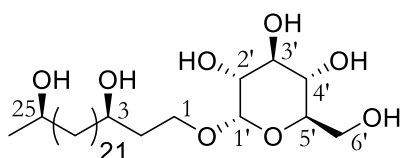
3-[α -D-galactosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactosil]-1,2-diacil-sn-glicerol (**30-31**)



RMN- H^1 (300 MHz, CD_3OD): δ 4.43 (m, 1H, H_{sn-1a}), 4.21 (m, 1H, H_{sn-1b}), 5.25 (m, 1H, H_{sn-2}), 3.91 (m, 1H, H_{sn-3a}), 3.75 (m, 1H, H_{sn-3b}), 4.26 (m, 1H, $H-1'$), 3.50 (m, 1H, $H-2'$), 3.51 (m, 1H, $H-3'$), 3.73 (m, 1H, $H-4'$), 3.72 (m, 1H, $H-5'$), 3.78 (m, 2H, $H-6'$), 4.88 (d, 1H, $J=3$ Hz, $H-1''$), 3.90 (m, 1H, $H-2''$), 3.74 (m, 1H, $H-3''$), 3.90 (m, 1H, $H-4''$), 3.70 (m, 1H, $H-5''$), 3.95 (m, 2H, $H-6''$). **RMN- C^{13}** (75 MHz, CD_3OD): δ 63.96 (C_{sn-1}), 71.1 (C_{sn-2}), 68.7 (C_{sn-3}), 105.2 ($C-1'$), 74.60 ($C-2'$), 72.4 ($C-3'$), 70.2 ($C-4'$), 71.4 ($C-5'$), 67.8 ($C-6'$), 100.5 ($C-1''$), 74.5 ($C-2''$), 72.3 ($C-3''$), 71.7 ($C-4''$), 71.05 ($C-5''$), 62.8 ($C-6''$).

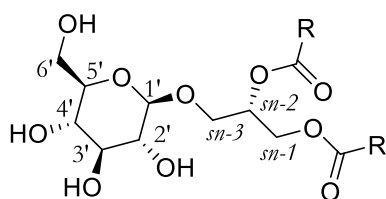
$[\alpha]_D^{20} = +57.4^\circ$ ($c=1.0$, MeOH).

(3R,25R)-3,25-Dihidroxiheacosil α -D-glucopiranosido (**32**)



RMN- H^1 (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.02 (d, 3H, $J=6.2$ Hz, $H-26$), 1.19-1.38 (m, 44H), 1.50-1.69 (m, 2H, $H-2$), 3.56 (m, 1H, $H-25$), 3.70 (m, 1H, $H-1a$), 3.45 (m, 1H, $H-1b$), 3.54 (m, 1H, $H-3$), 4.63 (d, 1H, $J=4.4$ Hz, $H-1'$), 3.10 (m, 1H, $H-2'$), 3.35 (m, 1H, $H-3'$), 3.18 (m, 1H, $H-4'$), 3.41 (m, 1H, $H-5'$), 3.48 (m, 1H, $H-6'a$), 3.60 (m, 1H, $H-6'b$). **RMN- C^{13}** (125 MHz, $DMSO-d_6$): δ 98.6 ($C-1'$), 70.25 ($C-2'$), 72.5 ($C-3'$), 71.9 ($C-4'$), 73.3 ($C-5'$), 60.9 ($C-6'$), 64.6 ($C-1$), 65.6 ($C-25$), 67.1 ($C-3$), 36.9 ($C-2$), 23.4 ($C-26$). **HRESIMS** m/z $[M+Na]^+$ 599.4480 (calculado para $C_{32}H_{64}NaO_8$ 599.4493). $[\alpha]_D^{23} = +45.0^\circ$ [$c=0.36$, $CHCl_3$:MeOH (2:1)].

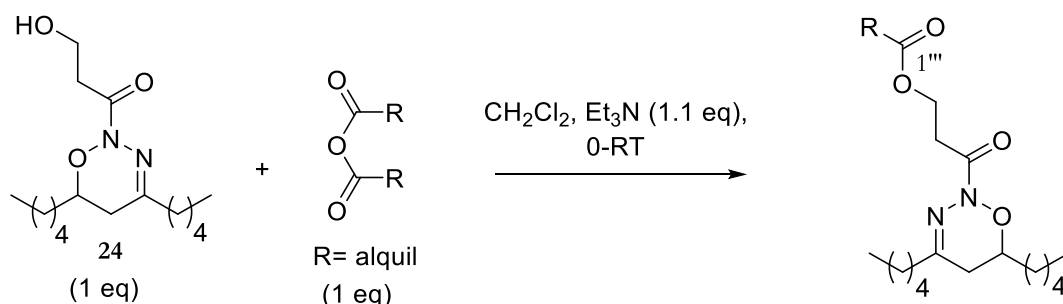
3- β -D-Glucosyl-1,2-diacil-sn-glicerol (**33-34**)



R: cadena alifática

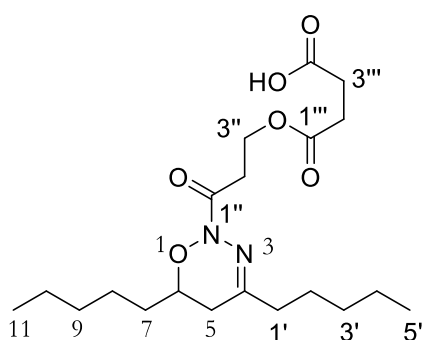
RMN- H^1 (300 MHz, CD_3OD): δ 4.50 (dd, 1H, $J=2.8, 12.1$ Hz, H_{sn-1a}), 4.20 (dd, 1H, $J=7.1, 12.1$ Hz, H_{sn-1b}), 5.30 (m, 1H, H_{sn-2}), 4.07 (m, 1H, H_{sn-3a}), 3.58 (m, 1H, H_{sn-3b}), 4.78 (m, 1H, $H-1'$), 3.41 (dd, 1H, $J=3.48, 9.65$ Hz, $H-2'$), 3.64 (m, 1H, $H-3'$), 4.11 (m, 1H, $H-4'$), 3.61 (m, 1H, $H-5'$), 3.12 (1H, m, $H-6'a$), 2.94 (dd, 1H, $J=9.0, 10.7$ Hz, $H-6'b$). **RMN- C^{13}** (75 MHz, CD_3OD): δ 71.7 (C_{sn-2}), 64.3 (C_{sn-1}), 67.1 (C_{sn-3}), 100.1 ($C-1'$), 73.4 ($C-2'$), 74.9 ($C-3'$), 69.8 ($C-4'$), 73.3 ($C-5'$), 54.2 ($C-6'$). $[\alpha]_D^{20} = +34.3^\circ$ ($c=0.04$, MeOH).

2.5.8 PROCEDIMIENTO GENERAL DE SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS ACILADOS DE 24



A una disolución de **24** (1.0 eq) en CH_2Cl_2 a 0°C , se adiciona Et_3N (1.1 eq), seguido del correspondiente anhídrido (1.1 eq). La mezcla se mantiene en agitación durante 5h. Tras observar la finalización de la reacción mediante TLC, se elimina el disolvente mediante destilación a presión reducida. El residuo oleoso remanente se purifica mediante cromatografía en columna.

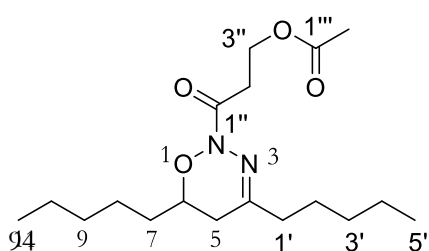
Ácido 4-(3-(4,6-dipentil-5,6-dihidro-2H-1,2,3-oxadiazin-2-il)-3-oxopropoxi)-4-oxobutanoico (**26**)



A partir de **24** (13 mg, 0.044 mmol, 1.0 eq.), Et_3N (7 μL , 0.048 mmol, 1.1 eq.) y anhídrido succínico (5 mg., 0.048 mmol., 1.1 eq), siguiendo el procedimiento general, el compuesto **26** se obtuvo con un rendimiento del 60 % tras una cromatografía en columna con Heptano:AcOEt (1:2) como un aceite incoloro.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4.43 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, H-3''), 4.04 (m, 1H, H-4), 2.95 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, H-2''), 2.63 (m, 4H, H-2'''/H3'''), 2.26 (m, 1H, H-5a), 2.24 (t, 2H, 8.4, H-1'), 2.13 (dd, 1H, $J = 8.8, 18.2$ Hz, H-5b), 1.73-1.25 (m, 14H), 0.89 (m, 6H, H-5'/H11). **RMN- ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3): δ 177.1 (C-4'''), 172.1 (C-1'''), 164.8 (C-1''), 150.4 (C-4, determinado por HMBC), 75.5 (C-6), 60.5 (C-3''), 37.2 (C-1'), 33.9 (C-7), 33.2 (C-2''), 31.6 (C-5), 31.4 (C-9), 28.8 (C-2'''/C-3'''), 25.5 (C-2'), 24.6 (C-8), 22.3 (C-10/C-4'), 14.0 (C-11/C-5'). **HRESIMS** m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 421.2304 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NaN}_2\text{O}_6$ 421.2309). $[\alpha]_D^{25} -63.2^\circ$ ($c = 0.047$, MeOH).

3-(4,6-dipentil-5,6-dihidro-2H-1,2,3-oxadiazin-2-il)-3-oxopropil acetato (**27**)



A partir de **24** (10 mg, 0.03 mmol, 1.0 eq.), Et_3N (4 μL , 0.036 mmol, 1.1 eq.) y anhídrido acético (3 μL ., 0.036 mmol., 1.1 eq), siguiendo el procedimiento general, el compuesto **27** se obtuvo con un rendimiento del 88 % tras una cromatografía en

columna con Heptano:AcOEt (2:1) como un aceite incoloro.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4.40 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, H-3''), 4.04 (m, 1H, H-4), 2.95 (m, 2H, H-2''), 2.26 (m, 1H, H5a), 2.24 (t, 2H, 8.4, H1'), 2.13 (dd, 1H, $J = 8.8, 18.2$ Hz, H-5b), 1.73-1.25 (m, 14H), 0.89 (m, 6H, H-5'/H11). **RMN- ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3): δ 171.1 (C-1''), 164.9 (C-1'), 150.4 (C-4, determinado por HMBC), 75.5 (C-6), 60.2 (C-3''), 37.2 (C-1'), 33.9 (C-7), 33.2 (C-2''), 31.6 (C-5), 31.4 (C-9), 25.5 (C-2'), 24.6 (C-8), 22.3 (C-10/C-4'), 21.1 (C-2''), 14.0 (C-11/C-5'). **HRESIMS** m/z $[\text{M}]^+$ 363.2444 (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NaN}_2\text{O}_4$ 363.2435). $[\alpha]_D^{25} = -50.2^\circ$ ($c = 0.064$, MeOH).

2.5.9 REACCIONES DE DESACILACIÓN DE LOS GLICOLÍPIDOS

2.5.8.1. Desacilación enzimática.

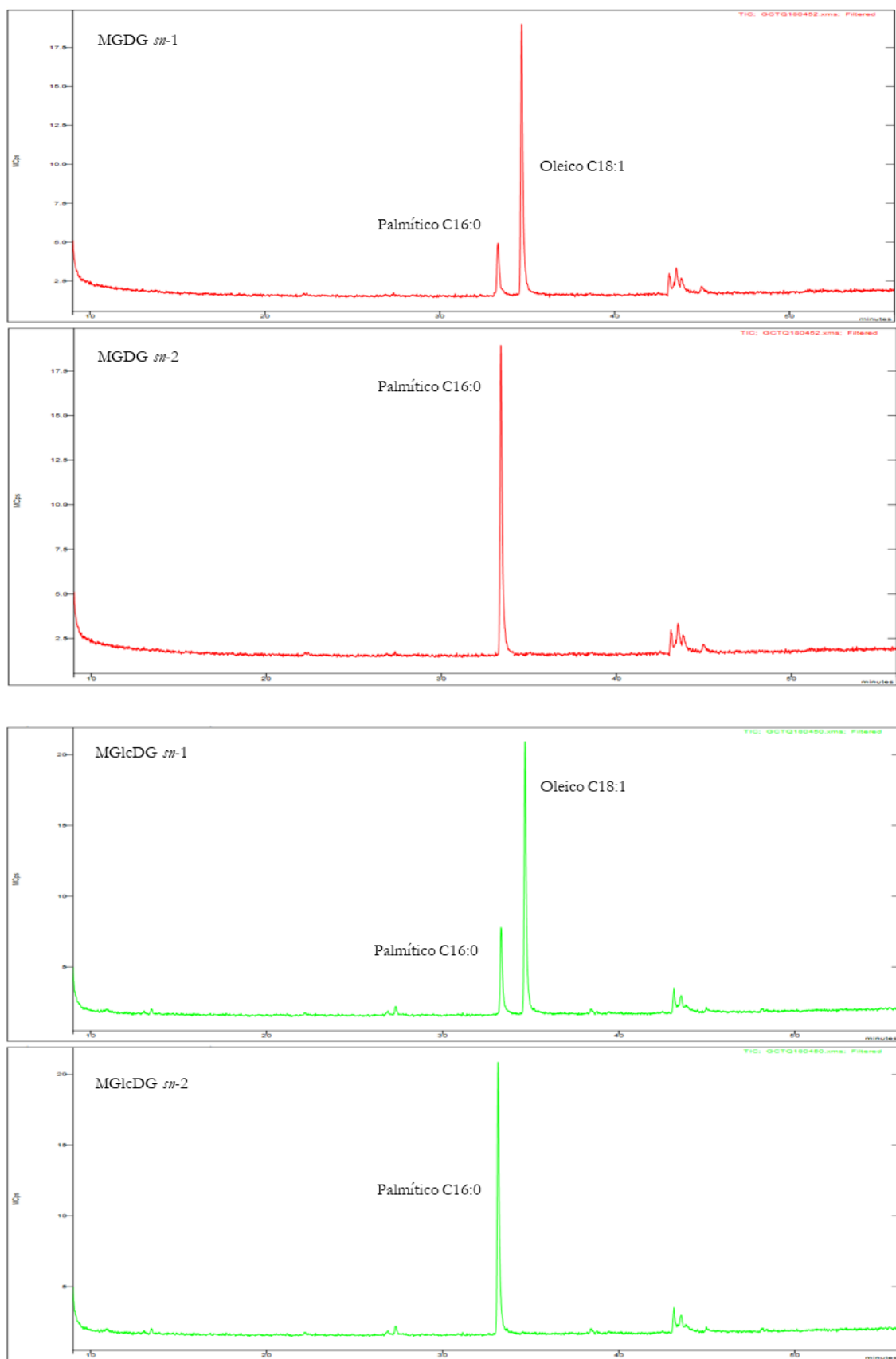
A una disolución del correspondiente glicolípido (**28-31**, **33-34**) con Lipasa XI (procedente de *Rhizopus arrhizus*) en presencia de Triton X-100 (2.5 mg), se agita a 37 °C durante 3h. Se observa la evolución de la reacción mediante TLC. Transcurrido el tiempo, se elimina el disolvente, mediante destilación a presión reducida, y se añade una mezcla Hexano-MeOH (4:1), obteniéndose dos fases: hexánica y metanólica.

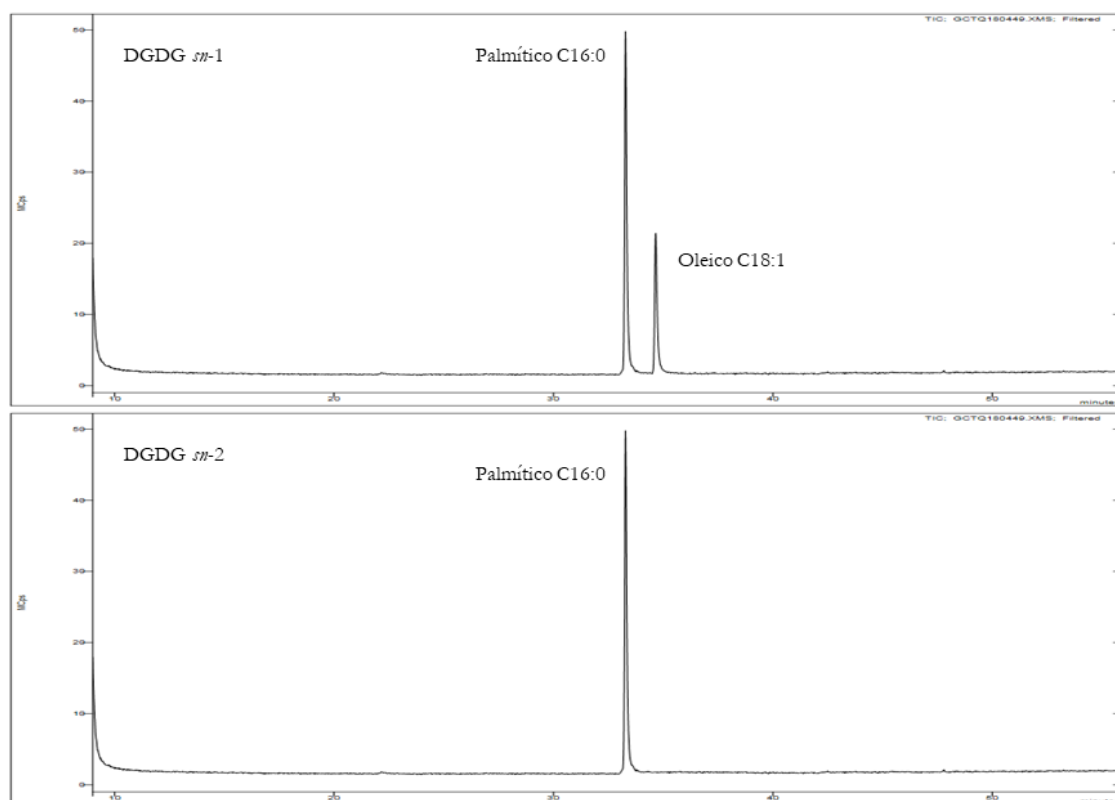
De la fase hexánica, se elimina el disolvente, mediante destilación a presión reducida, y el aceite resultante se esterifica utilizando MeOH con un 2% de H_2SO_4 (98%) a reflujo durante 12h. Se adiciona hexano y se realiza una extracción. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos están en la fase de hexano, el cual, se elimina a presión reducida, obteniéndose la mezcla de los ésteres metílicos. Se confirman los correspondientes ésteres metílicos mediante ^1H -RMN y se realiza el estudio de los mismos mediante cromatografía de GS/MS.

2.5.8.2. Desacilación química.

La fase metanólica, procedente de la desacilación enzimática, se trata con NaOMe y la reacción se mantiene en agitación durante 4h. Se quenchea la reacción adicionando MeOH, se elimina el disolvente mediante destilación a presión reducida y se realiza una extracción H_2O -Hexano (1:1). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente mediante destilación a presión reducida. Se confirma la presencia de los ésteres metílicos mediante RMN- ^1H y se realizó el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a masas.

2.5.8.3. Análisis de GC/MS de los ésteres metílicos de los ácidos grasos





CAPÍTULO 3:
ESTUDIO DE LA
CIANOBACTERIA
Cylindrospermum sp.
(GTBC-360)

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 EL CÁNCER COMO ENFERMEDAD

El cáncer es una enfermedad que representa uno de los mayores retos terapéuticos del siglo XXI, siendo responsable de más del 10% de muertes a nivel mundial y en algunos países hasta el 25%.¹ Según la última revisión llevada a cabo por las OMS en 2018, a nivel global ocurren 13 millones de nuevos casos al año y mueren alrededor de 7.6 millones de personas.² El más común es el cáncer de pulmón (2 millones), seguido del cáncer de mama (2 millones) y el cáncer colorrectal (1.8 millones). La alta incidencia de esta enfermedad ha motivado a investigadores de entidades privadas y públicas a estudiar tanto las causas como posibles tratamientos a una escala sin precedentes. La incidencia es altamente dependiente de la edad; en una investigación realizada en el Reino Unido se observó que el 65% de los cánceres ocurrían después de los 65 años.¹ En los niños, el tipo de cáncer más común es la leucemia y en hombres jóvenes entre 20-39 años es el cáncer de testículo.

Por lo general, el cáncer comienza como una mutación en una única célula y se va desarrollando a través de múltiples etapas, mediante la adquisición de mutaciones que son transmitidas a la progenie cuando esta se divide. Este tipo de eventos suelen ocurrir en células somáticas adultas y salvo en raras excepciones, la enfermedad termina con la muerte del paciente y no se propaga. Las mutaciones no son la única vía para la inactivación o activación de genes y proteínas clave. La expresión génica puede verse también fuertemente influenciada por una gran variedad de factores epigenéticos que alteran la estructura de la cromatina sin modificar la codificación del ADN y pueden ser transmitidas a sucesivas generaciones.³

La clasificación del cáncer es complicada debido a la gran variabilidad que existe. Los investigadores han llegado a una clasificación basada en el tipo de tejido donde se origina, la localización y las funciones desempeñadas por las células:⁴

- *Carcinoma*, se origina en las células epiteliales de la piel o en tejidos que cubren órganos, representan el 80% de cánceres humanos.
- *Sarcoma*, se origina en los huesos, cartílagos, grasas, músculos, vasos sanguíneos u otros tejidos conectivos.
- *Leucemia*, son los cánceres que se originan en los tejidos encargados de generar células sanguíneas, como la médula ósea, causando un gran número de células sanguíneas anormales.

¹ a) Torre, L. A.; Siegel, R. L.; Ward, E. M.; Jemal, A. *Cancer Epidemiol. Biomarkers*. **2016**, 25, 1-12. b) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.; Torre, L. A.; Jemal, A. *C.A. Cancer J. Clin.* **2018**, 68, 394-424.

² WHO (12 september **2018**). Latest global cancer data: Cancer burden rise to 1.8 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Geneva, Switzerland.

³ a) Hassanpour, S. H.; Dehghani, M. *J. Cancer Res. Prac.* **2017**, 4, 127-129. b) Bertran, J. S. *Mol. Aspects Med.* **2000**, 21, 167-223.

⁴ National cancer institute. Cancer classification. Recuperado de: <http://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>. Última visita: 27/01/2019.

- *Linfomas*, se originan en las células del sistema inmune.

En todos los organismos regulatorios de salud a nivel mundial, es prioritario mejorar la capacidad para predecir los tratamientos necesarios en las primeras etapas de la enfermedad, reduciendo la alta morbilidad y mortalidad asociadas al cáncer. La primera línea, es la prevención del mismo, ya que es sabido que existen ciertos tipos de tumores que están relacionados con estilos de vida inadecuados.⁵ Actualmente, se está desarrollando una nueva disciplina, la quimioprevención, cuyo fin es adelantarse a la aparición de células cancerosas.⁶ Sin embargo, a excepción de aquellos individuos con tumores que presenten una alta incidencia hereditaria, es difícil prever este tipo de eventos. En el caso de tratamientos invasivos como son las cirugías o el tratamiento con medicamentos citotóxicos, es clave llevar a cabo un análisis previo. Aunque se ha avanzado mucho en el diagnóstico temprano, aún es muy complejo poder predecir la aparición de cáncer en el organismo.⁷

3.1.2 TRATAMIENTO DEL CÁNCER Y RESISTENCIA

Una vez superada la barrera de prevención, cuando la enfermedad se ha puesto de manifiesto, el siguiente paso es el tratamiento. Históricamente, se ha utilizado la radioterapia y la quimioterapia como las principales vías para curar el cáncer. A pesar de que ambos métodos han resultado útiles, son inespecíficos, generando fuertes efectos secundarios en los pacientes como: dolor, náuseas, diarreas, cardiotoxicidad, pérdida de peso y depresión del sistema inmune. Además, es común encontrar que las células cancerosas supervivientes generen resistencia y evolucionen en un cáncer más agresivo.⁸

Para suplir estas carencias de los tratamientos clásicos, existen dos tipos de moléculas que se están estudiando y presentan más especificidad. Las primeras son, moléculas pequeñas orgánicas, encargadas de inhibir quinasas y prevenir la activación de las rutas metabólicas que están desreguladas durante el cáncer. El segundo tipo, son los anticuerpos monoclonales; su mecanismo de acción ocurre a través de la ruptura entre las interacciones ligando-receptor, o bloqueando el sitio de unión en una proteína.⁹ En nuestro caso, nos centraremos en las moléculas pequeñas orgánicas, ya que son el objetivo de esta tesis.

Una actividad inapropiada de las quinasas es la ruta más probable a través de la cual las células se vuelven cancerosas, evadiendo las restricciones del ciclo celular. Los inhibidores específicos actúan sobre sitios de unión del ATP en su forma activa o inactiva en las tirosina quinasas, y son utilizados sobre proteínas que sufren desregulación durante la progresión de la enfermedad como BCR-ABL, Akt o mTOR.¹⁰

⁵ a) Grosso, G.; Bella, F.; Godos, J.; Sciacca, S.; Del Rio, D.; Ray, S.; Galvano, F.; Giovannucci, E. L. *Nutr. Rev.* **2017**, 75, 405-419. b) Katzke, V. A.; Kaaks, R.; Kühn, T. *Cancer J.* **2015**, 21, 104-110.

⁶ Benetou, V.; Lagiou, A.; Lagiou, P. *F1000Res.* **2015**, 4, 1-10.

⁷ Schiffman, J. D.; Fisher, P. G.; Gibbs, P. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* **2015**, 57-65.

⁸ Urruticoechea, A.; Alemany, R.; Balart, J.; Villanueva, A.; Viñals, F.; Capellá, G. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16, 3-10.

⁹ Baudino, T. A. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, 12, 3-20.

¹⁰ Gerber, D. E. *Am. Fam. Physician.* **2008**, 77, 311-319.

Los fármacos que actúan sobre la proteína de fusión BCR-ABL han sido uno de los mayores logros en el tratamiento del cáncer. BCR-ABL se encuentra en todos los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC).¹¹ Entre estos, destacan Imatinib y dasatinib (figura 1, **I**) un inhibidor de segunda generación utilizado para aquellos pacientes que han generado resistencia a imatinib.¹²

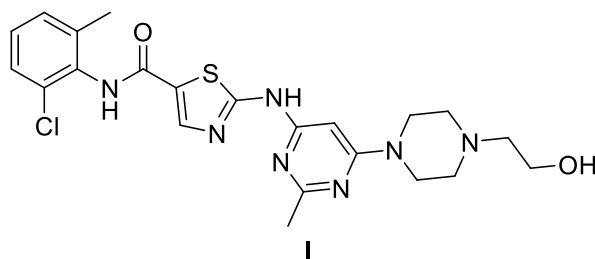


Figura 1. Estructura química de dasatinib.

La angiogénesis es la creación de nuevos sistemas vasculares a partir de los existentes, siendo clave a nivel fisiológico y patológico. Un tumor requiere de este proceso para poder expandirse y realizar la metástasis.¹³ La angiogénesis está regulada por numerosas citocinas incluyendo factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual ha mostrado ser clave en diferentes etapas.¹⁴ Por ello, es una de las dianas pro-angiogénicas más estudiadas y sobre la cual se han desarrollado nuevos inhibidores. El primero fue sorafenib (figura 2, **II**), aprobado en 2005 por la FDA para el tratamiento de cáncer de riñón.¹⁵ Vandetanib (figura 2, **III**) fue aceptado en 2011 para el tratamiento de cáncer sobre la glándula tiroidea.¹⁶ En 2012 se introdujeron cabozantinib¹⁷ (figura 2, **IV**) y axitinib¹⁸ (figura 2, **V**) para el tratamiento del cáncer sobre la glándula tiroidea y de riñón, respectivamente. En 2015 se aprobaron dos inhibidores de VEGF, regorafenib¹⁹ (figura 2, **VI**) y lenvatinib²⁰ (figura 2, **VII**). El gran logro de estos dos fármacos es que son capaces de detener algunos tipos de cáncer en su estado más avanzado, cuando ha sucedido la metástasis. La aprobación de cinco fármacos en los últimos siete años tomando como diana VEGF hace indicar que los resultados clínicos son muy satisfactorios y que es uno de los caminos a seguir en producción de nuevos remedios farmacológicos.

¹¹ a) Elefanty, A. G.; Hariharan, I. K.; Cory, S. *EMBO J.* **1990**, *9*, 1069-1078. b) Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, *9*, 28-39.

¹² Jabbour, E.; Kantarjian, H.; Cortes, J. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2015**, *6*, 323-334.

¹³ a) Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell.* **1996**, *86*, 353-364. b) Carmeliet, P.; Dor, Y.; Herbert, J. M.; Fukumura, D.; Brusselmans, K.; Dewerchin, M. *Nature.* **1998**, *394*, 485-490.

¹⁴ a) Folkman, J.; Ingber, D. *Seminars Cancer Biol.* **1992**, *3*, 89-96. b) Folkman, J. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186.

¹⁵ Keating, G. M. *Target Oncol.* **2017**, *12*, 243-253.

¹⁶ Trimboli, P.; Castellana, M.; Virili, C.; Giorgino, F.; Giovannella, L. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 1-7.

¹⁷ Al-Salama, Z. T.; Keating, G. M. *Drugs.* **2016**, *18*, 1771-1778.

¹⁸ Keating, G. M. *Drugs.* **2015**, *75*, 1903-1913.

¹⁹ Finn, R. S. *Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *13*, 492-495.

²⁰ Frampton, J. E. *Target Oncol.* **2016**, *11*, 115-122.

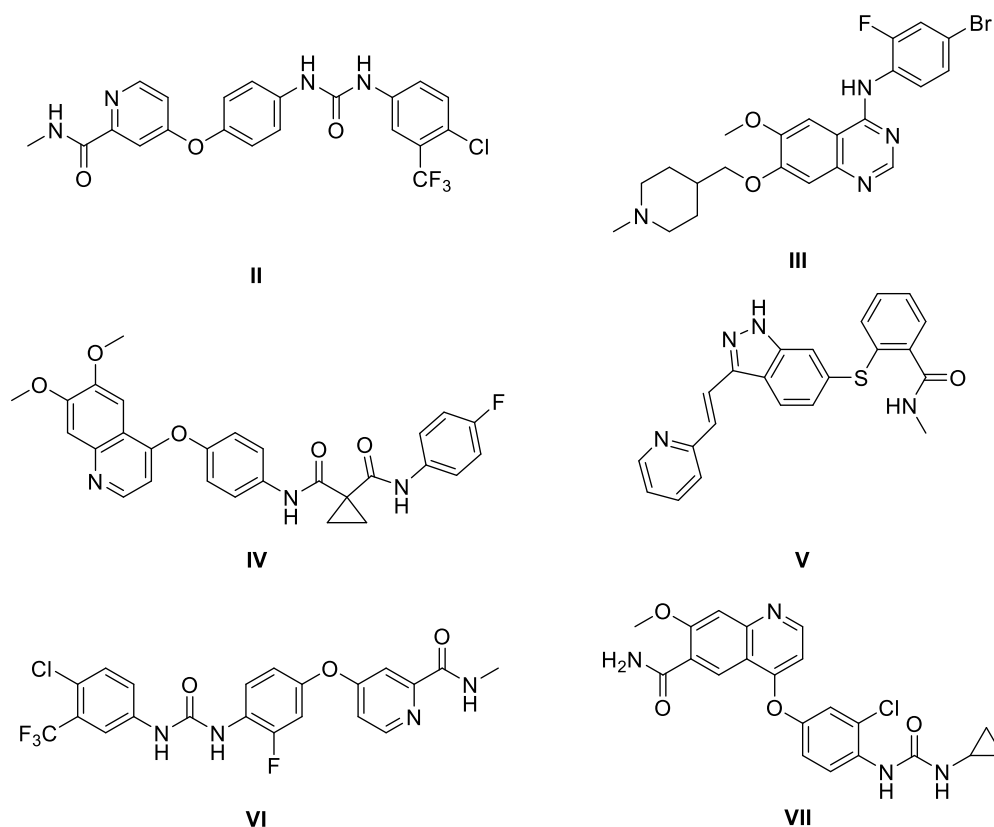


Figura 2. *Inhibidores de VEGF.*

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está involucrado en una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo el crecimiento celular, la proliferación, supervivencia, migración y la invasión de tejidos. El receptor está conformado por tres dominios distintos, una región extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. La unión de ligandos genera la dimerización del receptor y se activa el dominio de tirosina quinasa.²¹ Se ha demostrado que la expresión de EGFR y su actividad están desreguladas en la mayoría de tumores epiteliales humanos, por lo que es una diana potencial para promover nuevos tratamientos.²² El primer medicamento desarrollado sobre este receptor fue gefitinib en 2003. Posteriormente en 2012 se descubrió osimertinib (figura 3, **VIII**), utilizado para el tratamiento del cáncer de pulmón con una mutación específica.²³ En 2017 fue aprobado neratinib (figura 3, **IX**) para el cáncer de mama en estado avanzado.²⁴ En 2018, dacomitinib (figura 3, **X**) estaba siendo revisado por la FDA para su comercialización en el tratamiento de cáncer de pulmón como un inhibidor selectivo e irreversible de EGFR.²⁵

²¹ Herbst, R. S. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, 59, 21-26.

²² Sigismund, S.; Avanzato, D.; Lanzetti, L. *Mol. Oncol.* **2018**, 12, 3-20.

²³ Lamb, Y. N.; Scott, L. J. *Target. Oncol.* **2017**, 12, 555-562.

²⁴ Baselga, J.; Coleman, R. E.; Cortés, J.; Janni, W. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2017**, 119, 113-122.

²⁵ Reckamp, K. L.; Giaccone, G.; Camidge, D. R.; Gadgeel, S. M.; Khuri, F. R.; Engelman, J. A.; Koczywas, M.; Rajan, A. *Cancer.* **2014**, 120, 1145-1154.

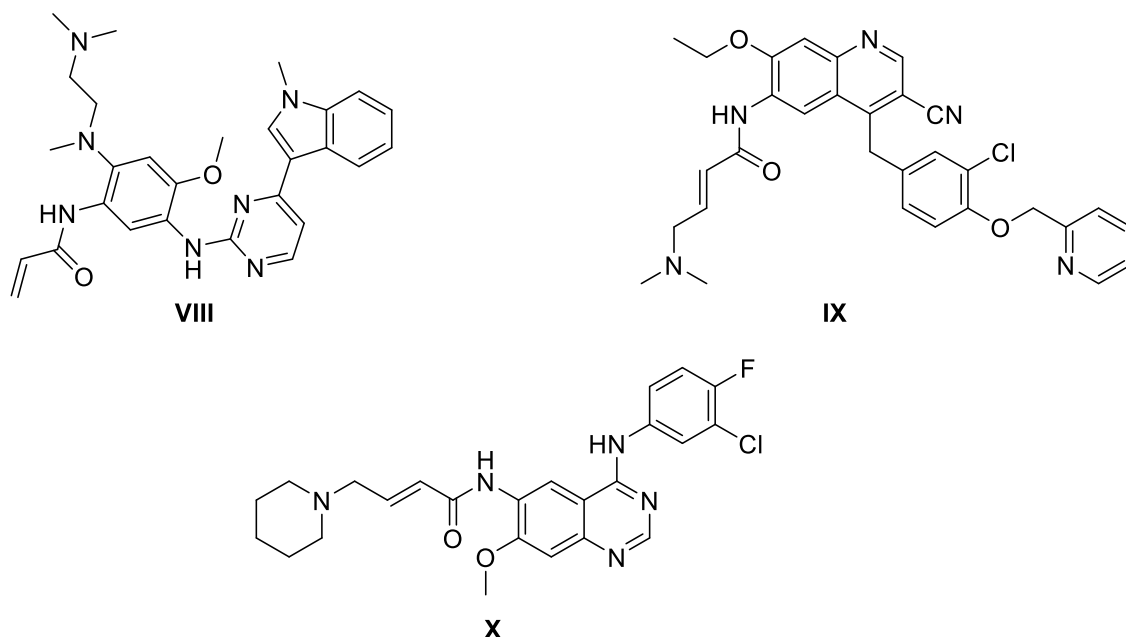


Figura 3. Inhibidores de EGFR.

Estos nuevos inhibidores de quinasas están resultando ser una herramienta muy útil para los oncólogos, permitiendo a los pacientes vivir más y tener una mejor calidad de vida, al disminuir los efectos secundarios del tratamiento. Sin embargo, se continúa librando la batalla contra el cáncer, ya que, pese a la novedad con estos tratamientos, existen ciertos tipos de cáncer que ya han mostrado resistencia. Esto requiere que se sigan descubriendo nuevas moléculas y la inhibición de otras rutas o vías de señalización.

3.1.3 LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT

Las quinasas Janus (JAK1 y JAK2) forman parte de la ruta de señalización JAK/STAT, que se encarga de regular mecanismos esenciales de las células, tales como: la proliferación, supervivencia, la inflamación y procesos inmunitarios.²⁶

Se ha determinado que la desregulación de esta vía está involucrada en diferentes tipos de tumores. En la mayoría de pacientes con neoplasma mieloproliferativos ocurren mutaciones de JAK2.²⁷ Además, en los pacientes con mielofibrosis ocurre una hiperactivación de la ruta de señalización JAK/STAT. También se ha observado que en estados avanzados de algunos tumores, cuando ocurre la metástasis y se incrementa la angiogénesis, la ruta está activada ininterrumpidamente.²⁸

El descubrimiento de la mutación en JAK2 hace que sea una diana terapéutica adecuada para el desarrollo de nuevos tratamientos.²⁹ Aunque no existen inhibidores de JAK2 en el mercado, actualmente se encuentran diferentes candidatos en etapas muy

²⁶ a) Wilks, A. F. *Mol. Cell Biol.* **1991**, 11, 2057-2065. b) Velazquez, L.; Fellous, M.; Stark, G. R.; Pellegrini, S. *Cell.* **1992**, 70, 313-322.

²⁷ a) Levine, R. L. *Cancer Cell.* **2005**, 7, 387-397. b) Kiladjian, J. J. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* **2012**, 1, 561-566.

²⁸ a) Lee, H. *Nat. Med.* **2010**, 16, 1421-1428. b) Jarnicki, A.; Putoczki, T.; Ernst, M. *Cell Div.* **2010**, 5, 1-15.

²⁹ Baffert, F.; et al. *Mol. Cancer. Ther.* **2010**, 9, 1945-1955.

avanzadas de los ensayos clínicos. Lestaurinib (figura 4, **XI**) desarrollado por Cephalon pasó a fase clínica III en 2014, y ha sido investigado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, entre los que se encuentran el de páncreas y el de próstata.³⁰ Mometinib (figura 4, **XII**) superó en el año 2016 la fase clínica II y está siendo probado para el tratamiento de mielofibrosis.³¹ Pacritinib (figura 4, **XIII**), también utilizado para el tratamiento de la mielofibrosis, se encuentra en estudios de fase clínica III.³²

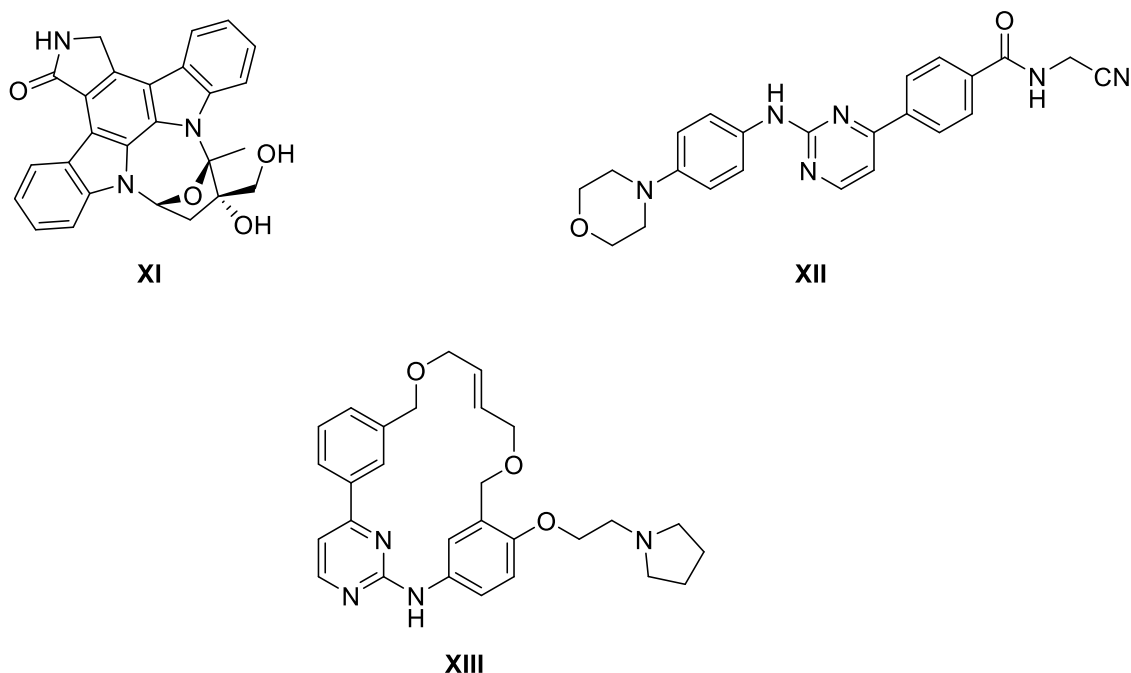


Figura 4. Inhibidores de JAK2.

Recientemente, se ha descubierto que una aberración en IL-6/STAT3 podría estar involucrada en la transcripción de ARN no codificante, y podría llegar a ser utilizada como una potencial diana terapéutica.³³ Estos descubrimientos en la ruta de señalización JAK/STAT tienen una implicación para entender la misma en diversos carcinomas, sarcomas y linfomas.

Por el interés que suscitan dichas dianas para el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos selectivos, la empresa Valorialia I más D ha volcado su esfuerzo en investigar los extractos procedentes de cianobacterias de su biblioteca sobre la inhibición de JAK/STAT.

³⁰ a) Shabbir, M.; Stuart, R. *Expert Opin. Investig. Drugs*. **2010**, *19*, 427-436. b) Hexner, E.; Roboz, G.; Hoffman, R. *Br. J. Haematol.* **2014**, *164*, 83-93.

³¹ Winton, E. F.; Kota, V. *Future Oncol.* **2017**, *13*, 395-407.

³² Macarenhas, J.; Hoffman, R.; Talpaz, M.; et al. *JAMA Oncol.* **2018**, *4*, 652-659.

³³ Wu, J.; et al. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**, *34*, 116-126.

3.2 OBJETIVOS

Entre las distintas cepas, propiedad de Valoralia I más D, se eligió la cepa GTBC-360, por su potencial actividad antitumoral. Apoyados en estudios previos de actividad, se marcaron los siguientes objetivos:

- 1) Realizar la separación y análisis físico-químico de la cianobacteria *Cylindrospermum* sp. (GTBC-360).
- 2) Determinar la estructura del metabolito o metabolitos responsables de su actividad biológica.
- 3) Valorar la actividad biológica de los metabolitos, analizando tanto la actividad terapéutica como los parámetros de citotoxicidad.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 GTBC-360 ESTUDIOS PRELIMINARES

Cylindrospermum sp. (GTBC-360) fue recolectada en el parque nacional de Garajonay, La Gomera, y crecida en condiciones axénicas en Valoralia I más D. Tras ser extraído con disolventes orgánicas (ver desarrollo experimental, 3.5.4.1), el extracto crudo (EO-360) fue probado en diferentes líneas celulares (tabla 1).

Tabla 1. *Actividad antitumoral y viabilidad exhibida por el extracto crudo de GTBC-360.*

| Viabilidad PBMCs | | Actividad antitumoral | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| MTT | LDH | SK-MEL-5 | SK-MEL-28 | K562 |
| (CC ₅₀ µg/mL) | (CC ₅₀ µg/mL) | (IC ₅₀ µg/mL) | (IC ₅₀ µg/mL) | (IC ₅₀ µg/mL) |
| 90.3 | 81.7 | 55.7 | 63.0 | 50.0 |

Los ensayos realizados con el extracto crudo dieron como resultado valores similares de inhibición en las tres líneas de cáncer. En las dos líneas de melanoma SK-MEL-5 y SK-MEL-28, los valores de IC₅₀ fueron de 55.7 y 63.0 µg/mL, respectivamente. Sobre la línea de células inmortalizadas de leucemia K562, el valor de IC₅₀ era algo menor. Estos valores iniciales mostraban que el extracto crudo orgánico era poco selectivo entre las diferentes líneas celulares probadas.

Para probar la viabilidad celular, se utilizaron PBMCs mediante el ensayo MTT (actividad mitocondrial) y LDH (actividad de membrana); los ensayos revelaron que el extracto presentaba selectividad entre células tumorales y células sanas. Los valores de CC₅₀ obtenidos tanto a nivel mitocondrial como de membrana resultaron muy similares.

3.3.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO EO-360

Se partió de 8 g. de biomasa seca de GTBC-360, que fue extraída con CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y metanol, dando como resultado el extracto orgánico EO-360 (1.5 g), que era bioactivo.

El extracto orgánico EO-360 fue sometido a un primer fraccionamiento sobre cromatografía en columna de sílica, utilizando como eluyente un gradiente que comenzó con AcOEt, seguido de CH_2Cl_2 (15:1) y, finalmente, CH_2Cl_2 -MeOH (5:1) (ver desarrollo experimental, 3.5.4.1). De este fraccionamiento se obtuvieron cinco fracciones (A-E), pero únicamente, las fracciones A y B fueron bioactivas, por lo que se procedió al estudio de estas fracciones.

La fracción A (765 mg) se volvió a fraccionar por cromatografía en columna de sílica y utilizando como eluyente un gradiente de heptano-AcOEt (3:1) y heptano-AcOEt (1:1), obteniéndose seis nuevas fracciones, de las que se lograron aislar cuatro compuestos puros, que son los responsables de la actividad antitumoral (ver desarrollo experimental, 3.5.4.2).

La fracción B (74 mg) es mezcla de las fracciones A y C, por lo que la actividad es debida a mezcla de sustancias presentes en la fracción A; por este motivo, no fue analizada.

3.3.3 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

3.3.3.1 Determinación estructural de EO-360 A-V (1)

El espectro de masas de alta resolución HRESIMS del compuesto **1** manifiesta una distribución isotópica en la que se observaban los picos para $[\text{M} + \text{Na}]^+$ con m/z 829.2533, 831.2548, 833.2507 y 835.2588; la distribución presentada, es característica de moléculas que contienen cloro. Estos datos están en consonancia con la fórmula molecular $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_8\text{NaCl}_4$, e indica un grado de insaturación 11. Sin embargo, el espectro de RMN- C^{13} muestra únicamente, 19 carbonos, lo que lleva a pensar que el metabolito **1** es simétrico. La combinación de los espectros de RMN- C^{13} (figura 5) y DEPT-135 indican que el compuesto **1** presenta cinco carbonos cuaternarios, seis metinos, siete metilenos y un metilo; estos datos nos confirman que la molécula es simétrica y que en realidad, se observan la mitad de los átomos de carbono, por lo tanto, debe poseer diez carbonos cuaternarios, doce metinos, catorce metilenos y dos metilos. La correlación entre las señales de RM- H^1 y C^{13} , se llevó a cabo mediante el espectro bidimensional HMQC.

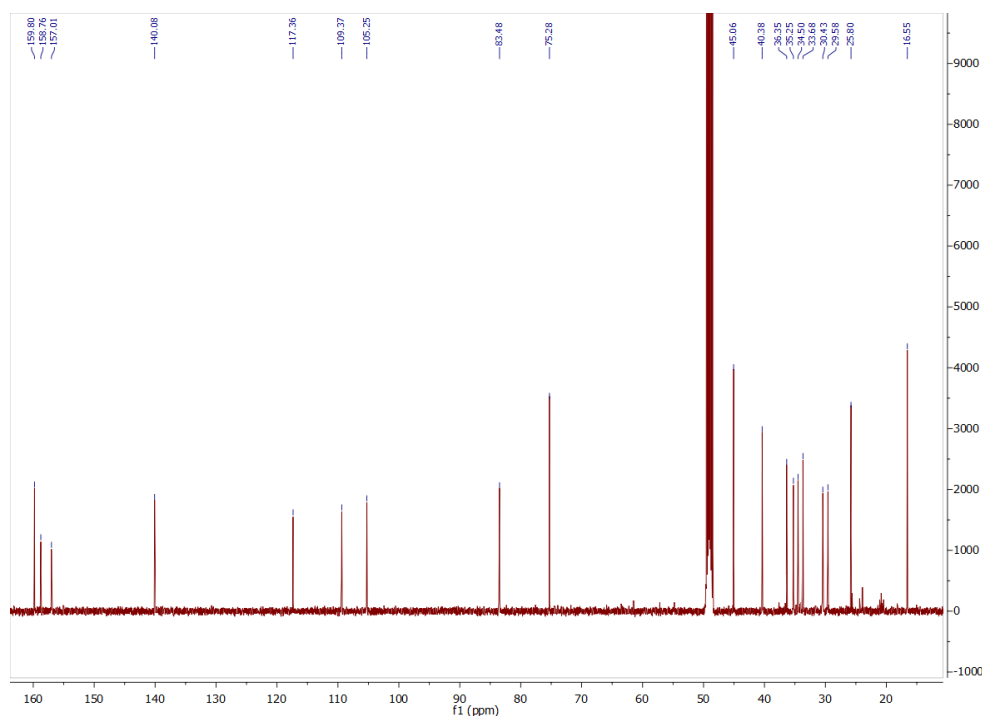


Figura 5. *Espectro de RMN- C^{13} de EO-360 A-V.*

En el espectro de RMN- H^1 (figura 6), se observaban algunas señales muy características que han resultado claves en la caracterización inequívoca. A campo bajo aparecen dos señales singletes δ_H 6.14 (2H, s) y 6.20 (2H, s), que muestran correlación HMQC con los carbonos a δ_C 105.2 y 109.4, respectivamente; estas señales son características de protones unidos a anillos aromáticos. La señal triplete a δ_H 5.82 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz), acoplada mediante HMQC a δ_C 75.3, es típica de un CH unido a un átomo de oxígeno o a dos átomos de cloro.³⁴ El doblete a δ_H 4.81 (2H, $J = 9.6$ Hz) se encuentra correlacionado con δ_C 83.5, siendo esta, una señal característica de un CH unido a un átomo de oxígeno. A δ_H 3.20 (2H) se encuentra una señal multiplete correlacionada con un CH a δ_C 36.3. El alto desapantallamiento en la señal de H^1 indica la cercanía de grupo electroattractores. Entre δ_H 0.64 y 2.23 se observan agrupaciones de señales complejas que, a través de HMQC, se ha determinado que se corresponden con restos alifáticos. En este grupo de señales aparecía una señal a δ_H 1.00 (d, 6H, $J = 6.4$ Hz) correspondiente a dos grupos metilo y correlacionada con δ_C 16.6.

³⁴ Geoffrey, E. H.; Smith, R. A.; Roberts, J. D. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1276-1290.

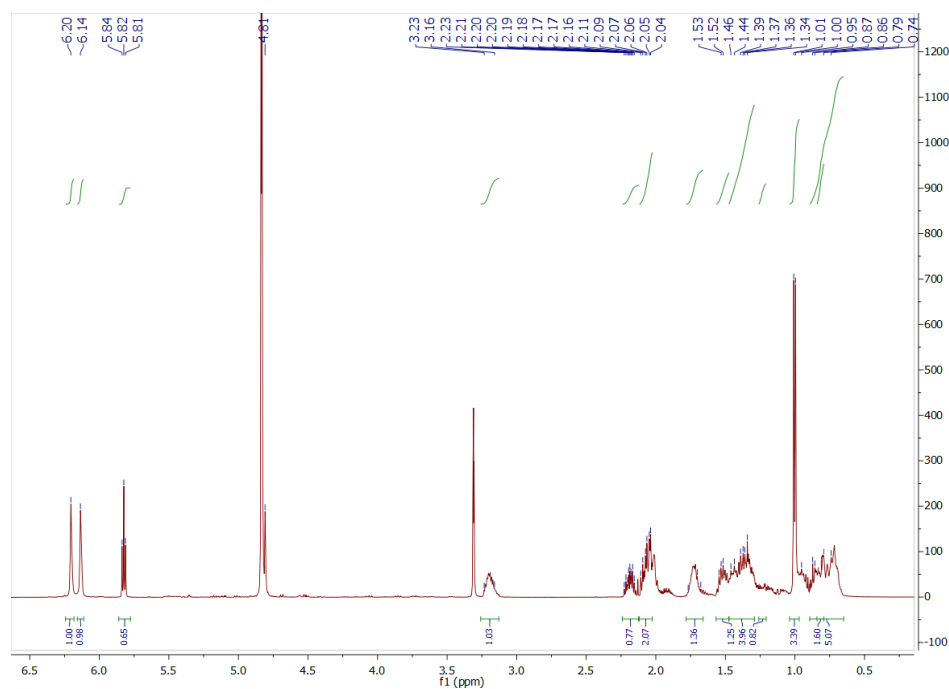


Figura 6. Espectro RMN- ^1H de EO-360 A-V.

La combinación de los espectros de COSY y HSQC-TOCSY, permitieron la caracterización inequívoca del sistema de spin **A** que va del carbono C-1 a C-30, en el cual sobre las posiciones C-1, C-7 y C-30 se encuentran sustituciones que no se pudieron identificar con los datos analizados hasta el momento (figura 7).

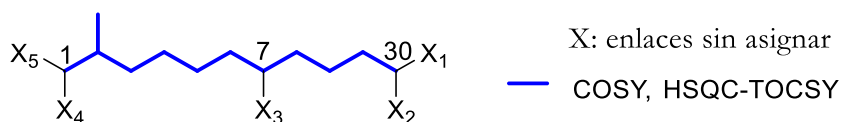


Figura 7. Sistema de spin **A**, asignado por combinación de COSY y HSQC-TOCSY.

Seis de las señales que quedaban sin asignar se correspondían con un resto dihidroxibenceno *para*-disustituido. Las señales de los carbonos fenólicos aparecían a δ_{C} 157.0 (C-13/C-26) y 158.8 (C-9/C-22); las señales correspondientes a los metinos aromáticos se encontraban a δ_{C} 109.4 (C-12/C-25) y 105.2 (C-10/C-23), estando correlacionadas mediante HMQC con δ_{H} 6.13 (s, 2H, H-12/H-25) y 6.22 (s, 2H, H-10/H-23) respectivamente. Los carbonos *para* sustituidos se encontraban a δ_{C} 117.3 (C-8/C-21) y 140.1 (C-11/C-24). La distribución que presentaban los sustituyentes en el anillo aromático se analizó mediante el experimento HMBC: H-10 mostró correlación $^2,3J_{\text{CH}}$ con C-9 y C-8. H-12 con C-11, C-8 y C-13. Con estas correlaciones se obtuvo el sistema de spin **B** (figura 8). El hecho de que se observen los dos carbonos fenólicos y los dos metinos aromáticos a diferente desplazamiento químico, indican que las posiciones no son intercambiables mediante ninguna operación de simetría, por tanto, el anillo aromático debe adquirir una orientación espacial preferencial.

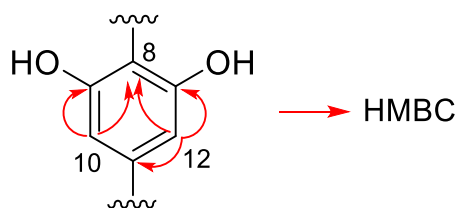


Figura 8. Sistema de spin **B**, asignado para el resto dibidroxibenceno para-disustituido.

La correlación entre los sistemas de spin **A** y **B**, se obtuvo mediante el experimento HMBC: C-10 y C-12 mostraron $^2J_{CH}$ con el metino correspondiente a C-14; el protón del metino correspondientes a C-7 y los protones de los metilenos correspondientes a C-6 y C-27 exhibieron correlación con C-8; el protón H-1 mostró correlación $^2J_{CH}$ con el carbonilo C-38, el cual presenta un desplazamiento característico de carbamidas primarias (δ_C 156.4). Con estos resultados sólo quedaba por determinar los sustituyentes de las posiciones C-30 y C-34, los cuales deben estar sustituidos cada uno por dos átomos de cloro, según se corresponde con el espectro de masas. Puesto que la molécula era simétrica, la estructura plana es la observada en la figura 9.

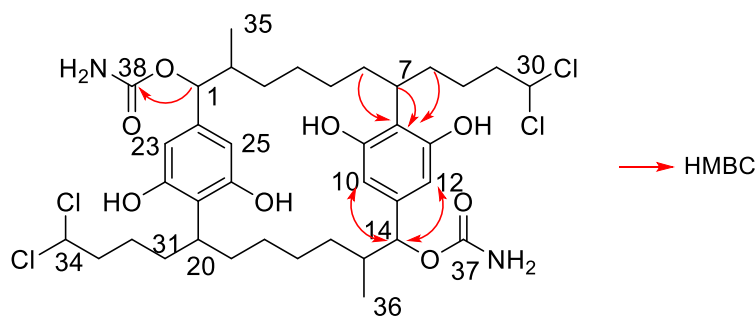


Figura 9. Estructura plana del carbamidociclofano **A**.

Una vez obtenida la estructura, se realizó una búsqueda en la base de datos SciFinder y se descubrió que ya estaba descrita en la bibliografía como el *carbamidociclofano A*; (**1**), los datos espectroscópicos (ver desarrollo experimental, 3.5.5) estaban en consonancia con los de la literatura.³⁵ Sin embargo, sólo está detallada su configuración relativa y debido al interés que podría tener el conocimiento de la configuración absoluta para relacionarlo con otros carbamidociclofanos, se decidió estudiarla, al disponerse de un monocristal.

La configuración absoluta se obtuvo mediante difracción de rayos X de monocristal. Se pudo determinar utilizando como fuente de ionización Molibdeno, gracias a la dispersión anómala del cloro. El *carbamidociclofano A* cocrystalizó con varias moléculas de disolvente, dos de acetona y dos de acetato de etilo, que presentan enlace de hidrógeno con los fenoles aromáticos. La difracción de rayos X (figura 10) muestra la orientación preferencial de los anillos aromáticos de forma paralela en la cual existe una menor repulsión y se encuentra optimizada la interacción de tipo π - π , esto corrobora los datos

³⁵ Bui, H. T. N.; Jansen, R.; Hang, T. L.; Sabine, M. J. *Nat. Prod.* **2007**, *70*, 499-503.

previos de RMN. La configuración absoluta para los carbonos fue: C-1 (R), C-2 (S), C-7 (R), C-14 (R), C-15 (S) y C-20 (R).

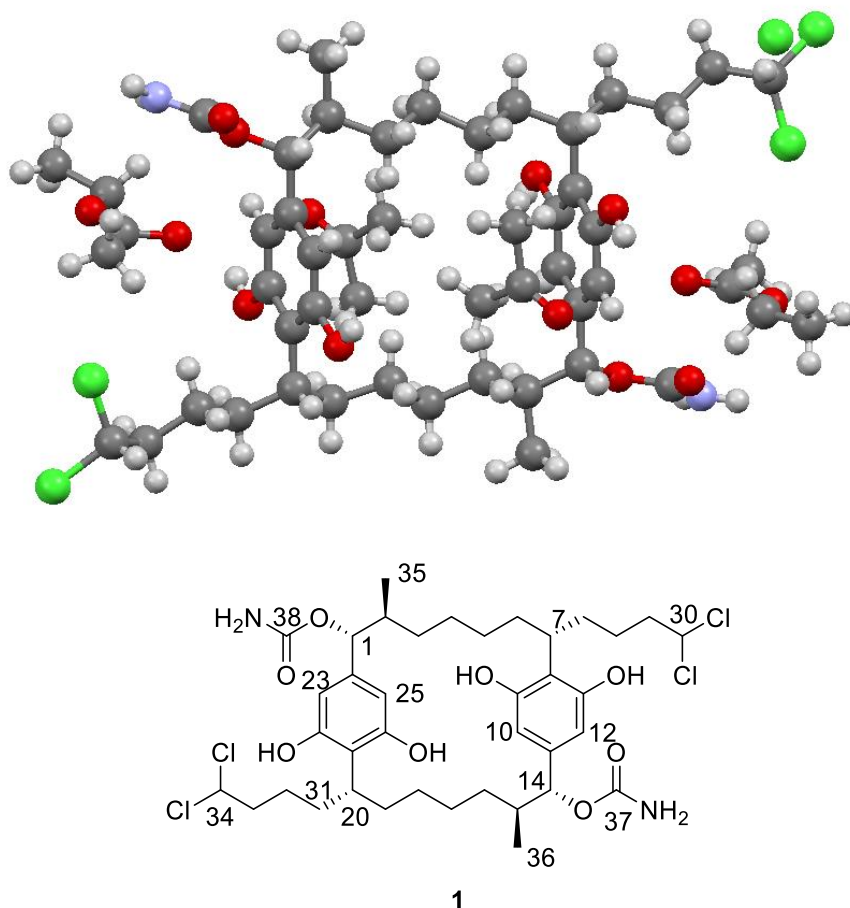


Figura 10. Configuración absoluta del carbamidociclofano *A*.

3.3.3.2 Determinación estructural de EO-360 A-IV (**2**)

La molécula **2** presentó un espectro de masas de alta resolución HRESIMS con una distribución isotópica $[M + Na]^+$ de m/z 786.2489, 788.2439, 790.2439 y 792.2344, dando a entender que el compuesto **2** también tiene átomos de cloro. La fórmula molecular que se adecua al espectro de masas es $C_{37}H_{53}Cl_4NO_7$; esta fórmula molecular indicaba un grado de insaturación igual a 10. Los espectros de RMN C^{13} y H^1 (figura 11) exhibieron perfiles muy similares al observado para la molécula **1**. Sin embargo, en el espectro de RMN- C^{13} se detectan las 37 señales correspondientes a los átomos de carbono, indicando que no existe simetría. Si se hace un análisis comparativo de RMN entre los compuestos **1** y **2**, los cambios más significativos son: la aparición de una única señal correspondiente al grupo carbamato en el espectro de RMN- C^{13} (δ_C 159.8) y en el espectro de RMN- H^1 la señal correspondiente al CH-1, se encuentra a campo más alto δ_H 3.75 (d, 1H, J = 9.6 Hz); esto sería indicativo de que uno de los hidroxilos alifáticos no está acilado.

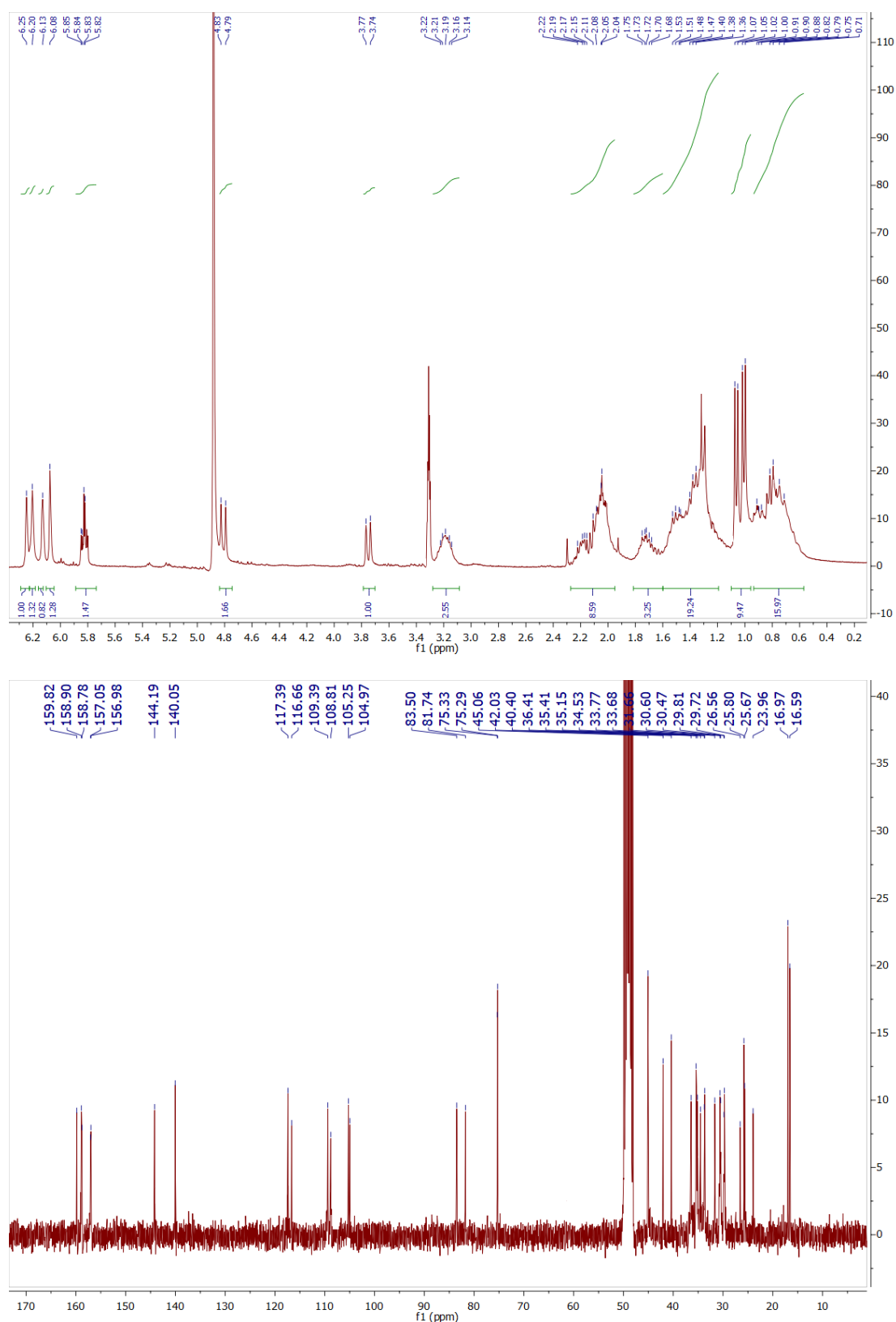


Figura 11. Espectros de RMN- H^1 - y C^{13} de EO-360 A-IV-2.

Con los datos conocidos (ver desarrollo experimental, 3.5.5), se realizó una búsqueda en Scifinder y se descubrió que el metabolito aislado se corresponde con el

carbamidociclofano **F** (figura 12); los datos espectroscópicos coincidían exactamente con los descritos en la literatura.³⁶

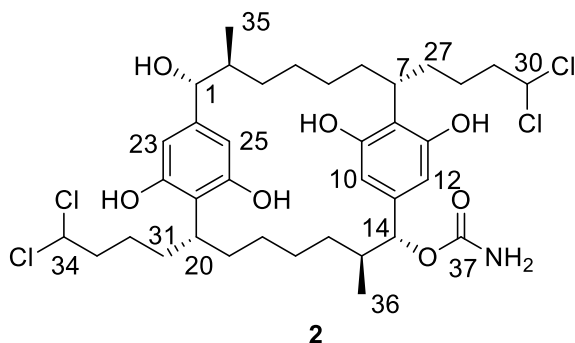


Figura 12. Estructura química del carbamidociclofano **F** (**2**).

3.3.3.3 Determinación estructural de EO-360 A-II (**3**)

La molécula **3** presenta un espectro de HRESIMS con una distribución isotópica $[M+Na]^+$ m/z 770.2521, 772.2532, 774.2489, 776.2436, correspondiente con una fórmula molecular $C_{37}H_{53}NO_6Cl_4$, y un grado de insaturación correspondiente a 10. En los perfiles de sus espectros de RMN- 1H y ^{13}C (figura 13) se obtuvieron patrones similares a los observados en el compuesto **1** y **2**, si bien, tampoco es simétrico como ocurre con **2**. Tras una búsqueda en la base de datos Scifinder, no se halló ningún resultado con estas características, por lo que se decidió llevar a cabo una caracterización exhaustiva del metabolito **3**.

³⁶ Luo, S.; Kang, H-S.; Kronic, A.; Chlipala, G. E.; Cai, G.; Chen, W-L.; Franzblau, S. G.; Swanson, S. M.; Orjala. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 686-689.

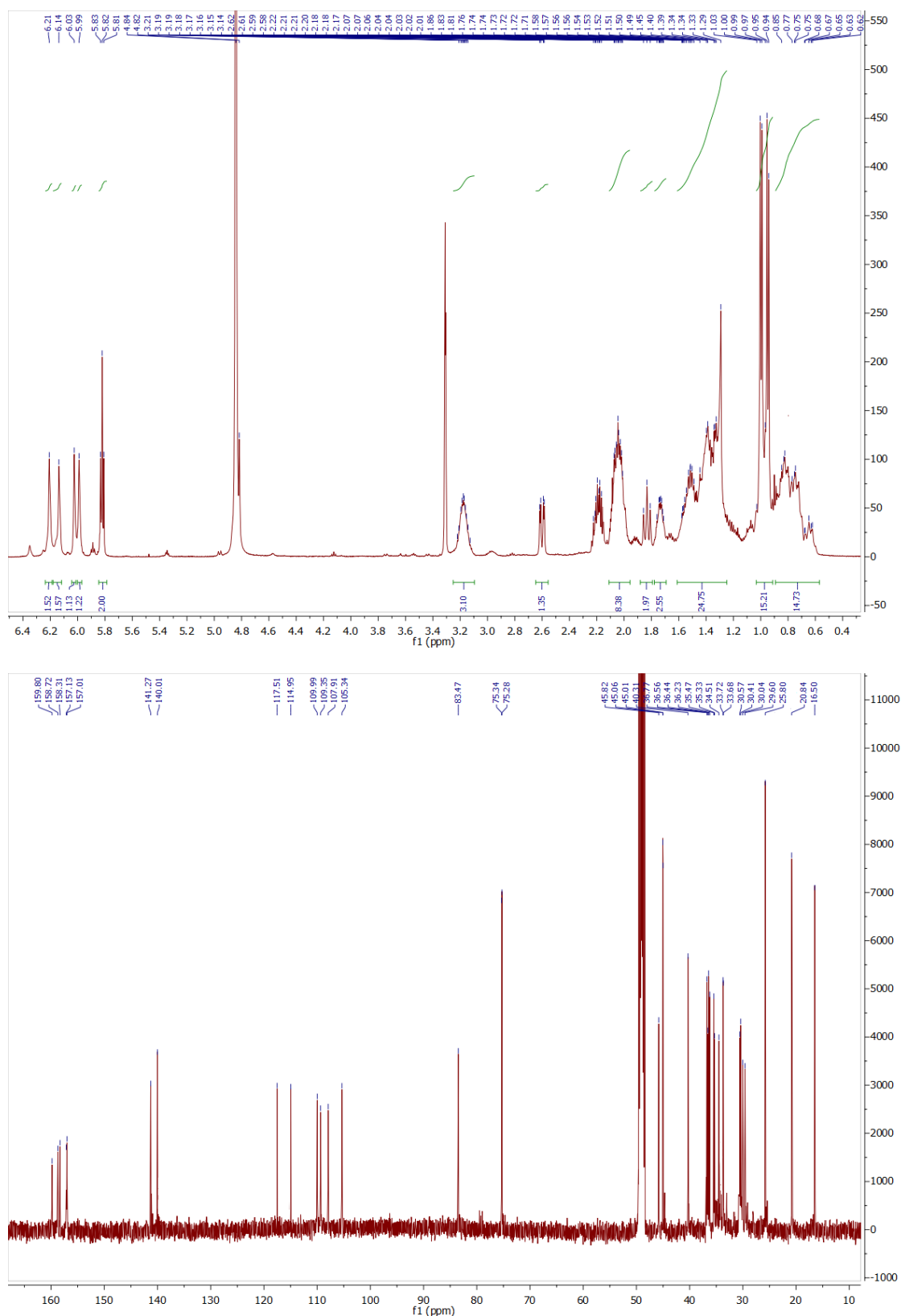


Figura 13. Espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de EO-360 A-II.

En el análisis exhaustivo del espectro de RMN- ^{13}C sólo se encontró una señal correspondiente al grupo carbamato δ_{C} 159.8 (C-37) y una correspondiente al grupo CH-O δ_{C} 83.5 (C-14). Además, se aprecia la aparición de un CH_2 a δ_{C} 45.8 el cual se correlacionó

mediante HMQC con δ_H 2.60 (dd, 1H, $J_1 = 3.7$ Hz, $J_2 = 13$ Hz, H-1a) y 1.83 (t, 1H, $J_2 = 13$ Hz). Estos datos parecen indicar la pérdida del grupo carbamato en la posición C-1 respecto al carbamidociclofano A (**1**). En el espectro de COSY se corroboró el acoplamiento entre los protones H-1 y H-2. La confirmación de la pérdida del grupo carbamato se obtuvo mediante el experimento HMBC, donde se observó una correlación $^2J_{CH}$ H-1 con los metinos aromáticos C-23 y C-25, así como, entre el metilo (C-35) y el CH-2 (figura 14). Todos los datos de RMN están tabulados en la tabla 2.

Tabla 2. Estructura química y datos de RMN del carbamidociclofano V en CD_3OD .

| Posición | δ_C , mult. | δ_H , mult. (J en Hz) | COSY | HMBC |
|----------|--|--|---------------------------|--|
| 1 | 45.8, CH ₂ | 2.60, dd (3.7, 13.0) 1.83, t (13.0) | 2 | 2, 23, 24, 25, 35 |
| 2 | 36.8, CH | 1.53, m | 1, 3, 35 | 1, 3, 4, 35 |
| 3 | 36.6, CH ₂ | 0.65, m 1.03, m | 2, 4 | 2, 4, 35 |
| 4/17 | 29.6, CH ₂ 30.0, CH ₂ | 0.83, m 1.44, m | 3 | 3, 5 |
| 5/18 | 30.4, CH ₂ 30.6, CH ₂ | 0.80, m 0.72, m | - | 7 |
| 6/19 | 35.5, CH ₂ 35.3, CH ₂ | 2.02, m 1.34, m | 7 | 7 |
| 7/20 | 36.2, CH 36.5, CH | 3.18, m | 6, 27 | 5/18, 6/19, 8/21, 9/22, 13/26, 27/31, 28/32 |
| 8 | 117.5, C | - | - | - |
| 9 | 158.3, C | - | - | - |
| 10 | 105.3, CH | 6.21, s | - | 8, 9, 11, 12, 14 |
| 11 | 140.0, C | - | - | - |
| 12 | 109.4, CH | 6.13, s | - | 8, 10, 13, 14 |
| 13 | 157.0, C | - | - | - |
| 14 | 83.5, CH | 4.83, d (10.0) | 15 | 10, 11, 12, 15, 36, 37 |
| 15 | 40.4, CH | 1.73, m | 14, 16, 36 | 14 |
| 16 | 34.5, CH ₂ | 0.71, m 0.79, m | 15, 17 | 14, 15, 17, 36 |
| 21 | 115.0 | - | - | - |
| 22 | 158.7 | - | - | - |
| 23 | 107.9, CH | 6.03, s | - | 1, 21, 22, 24, 25 |
| 24 | 144.2, C | - | - | - |
| 25 | 110.0, CH | 6.00, s | - | 1, 21, 23, 26 |
| 26 | 157.1, C | - | - | - |
| 27/31 | 33.7, CH ₂ | 2.07, m 2.18, m | 28/32, 30/34 27/31, | 27/31, 28/32, 30/34 |
| 28/32 | 25.8, CH ₂ | 1.38 | 29/33, 30/34 | 27/31, 29/33, 30/34 |
| 29/33 | 45.0, CH ₂ 45.1, CH ₂ | 2.07 2.18 | 28/32, 30/34 | 27/31, 28/32, 30/34 |
| 30/34 | 75.3, CH | 5.83, t (6.2) | 29/33 | 28/32, 29/33 |
| 35 | 20.8, CH ₃ | 0.94, d (6.5) | 2 | 1, 2, 3 |
| 36 | 16.5, CH ₃ | 0.99, d (6.4) | 15 | 14, 15, 16 |
| 37 | 159.8, C | - | - | 14 |

El compuesto **3** no ha sido previamente descrito y como pertenece a la familia de los carbamidociclofanos, y dado que se conoce hasta el carbamidociclofano U,³⁷ se ha decidido nombrar como *carbamidociclofano V* (figura 14).

Del espectro NOESY, se dedujo que la configuración relativa de C-14 y C-15 es *anti*, además, presentan una $J = 10.0$ Hz, igual a la mostrada en los carbamidociclofanos A y F; se confirmó que la configuración relativa era la misma a la observada en estos paraciclofanos. Con los datos de NOESY y el estudio en profundidad llevado a cabo por Nakamura *et al.*,³⁸ en el cual se demuestra que biosintéticamente sólo puede transcurrir la macrociclación siendo la posición C-2(*S*) y C-7(*R*), se puede asegurar, que la configuración absoluta (figura 14) del *carbamidociclofano V* es: C-2 (*S*), C-7 (*R*), C-14 (*R*), C-15 (*S*) y C-20 (*R*).

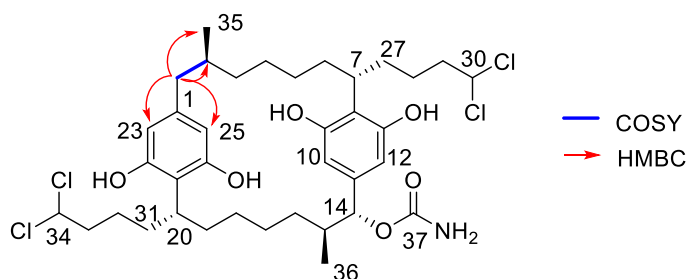


Figura 14. Configuración absoluta del carbamidociclofano V.

3.3.3.4 Determinación estructural de EO-360 A-VI (**4**)

El compuesto **4** exhibió un espectro de HRESIMS con una distribución isotópica $[M+Na]^+$ m/z de 865.2290, 867.2263, 869.2236, 871.2209; correspondiéndose con la fórmula molecular $C_{38}H_{55}Cl_5N_2O_8$; esta se correspondía con un grado de insaturación 10. La fórmula molecular se asemejaba del carbamidociclofano A, con las únicas diferencias de observarse un menor grado de insaturación, así como, un átomo de cloro e hidrógeno adicionales. Los espectros de RMN- 1H y ^{13}C (figura 15) muestran perfiles similares a los de los paraciclofanos anteriormente analizados, si bien, se encontraron algunas diferencias reseñables. Entre las diferencias más notables, cabe destacar que los protones de los anillos aromáticos aparecen solapados δ_H 6.21 (d, 4H, $J = 2.1$ Hz, H-13/H-17/H-32/H-36) y el otro protón aromático que resuena a δ_H 6.15 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-34) presenta un acoplamiento *meta* con dos de los protones a δ_H 6.21. Estos datos sugieren la presencia de un anillo aromático 1,3,5-trisustituido. Mediante la correlación HSQC se confirmó que el entorno químico de todas las señales aromáticas era el mismo, con un significativo aumento de la intensidad de señal en los carbonos δ_C 106.0 (C-13/C-17/C-32/C-36) y 159.2 (C-14/C-16/C-33/C-35), no observándose distinción entre los átomos de carbono, como ocurría en los paraciclofanos descritos anteriormente.

³⁷ Preisitsch, M.; Heiden, S. E.; Beerbaum, M.; Niedermeyer, T. H. J.; Schneefeld, M.; Herrmann, J.; Kumpfüller, J.; Thürmer, A.; Neidhart, I.; Wiesner, C.; Rolf, D.; Müller, R.; Bange, F. C.; Schmieder, P.; Schweder, T.; Mundt, S. *Mar. Drugs*. **2016**, *14*, 21.

³⁸ Nakamura, H.; Schultz, E. E.; Balskus, E. P. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 916-921.

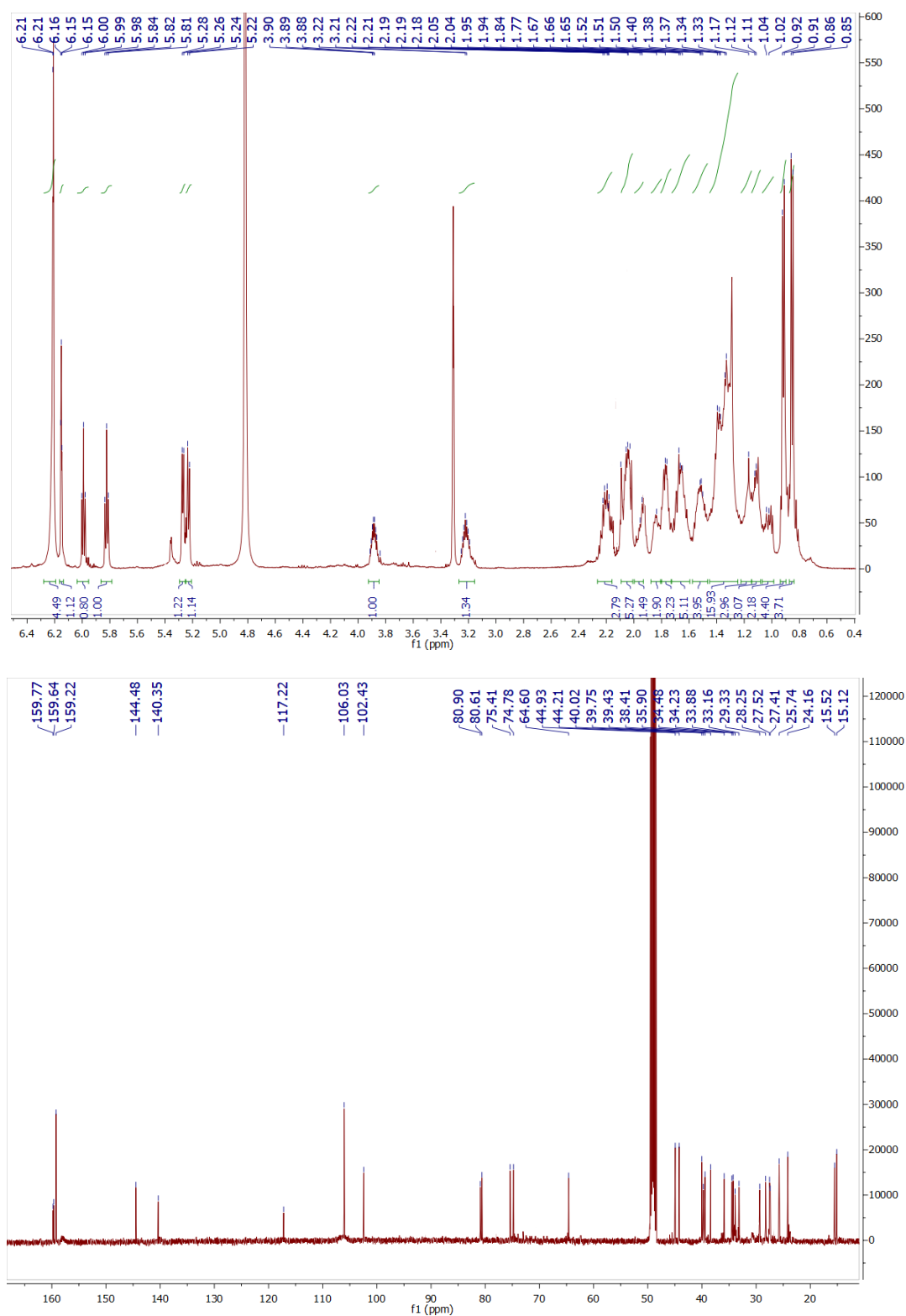


Figura 15. Espectros $\text{RMN-}^1\text{H}$ y $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de EO-360 A-VI-2.

Se confirmó la posición terminal de las cadenas alquílicas con dos átomos de cloro por los desplazamientos químicos de los CH-1, δ_{H} 5.99 (t, 1H, $J = 6\text{Hz}$, H-1), δ_{C} 74.8 (C-1), δ_{H} 5.82 (t, 1H, $J = 6\text{Hz}$, H-20) y δ_{C} 75.4 (C-20), muy similares a los correspondientes desplazamientos en el compuesto **3**. Los dos dobletes a δ_{H} 5.27 (d, 1H, $J = 5.7\text{Hz}$, H-11) y 5.23 (d, 1H, $J = 6.4\text{Hz}$, H-30), y sus correlaciones HMBC con los grupos carbamilo

δ_C 159.6 (C-19) y 159.8 (C-38), respectivamente, ponen de manifiesto que en los centros C-11 y C-30 hay restos de carbamida. Si se comparan estos desplazamientos químicos con los correspondientes CH que soportan los grupos carbamida en los paraciclofanos anteriores, hay diferencias significativas.

En el espectro de RMN- H^1 sólo se encuentra una señal asignable a los CH puente de los paraciclofanos δ_H 3.22 (m, 1H, H-24). Adicionalmente, se observa una señal a δ_H 3.89 (m, 1H, H-5), la cual estaba correlacionada mediante HSQC con δ_C 64.6 (C-5), que corresponde a un CH de la cadena alifática sustituida con un cloro. Todos los datos sugieren una apertura en el macrociclo de los paraciclofanos; no se logró hallar en la base de datos Scifinder ninguna referencia que coincidiera exactamente con el metabolito, pero se encontró una familia relacionada de paraciclofanos abiertos, los cilindrofridinos.³⁹ Ya que el compuesto no había sido descrito con anterioridad, se llevó a cabo su caracterización estructural más exhaustiva.

La combinación de COSY y HMBC fue clave para la identificación completa plana de la molécula **4** (tabla 3). El experimento COSY permitió asignar los dos sistemas de spín correspondientes a las cadenas alifáticas del macrociclo abierto y la ubicación de un átomo de átomo de cloro en la posición C-5. La posición C-10 contenía un resto metilo y la posición C-11 estaba di-sustituida con un anillo bencénico y un resto de carbamoilo. El otro sistema de spín correspondiente a la cadena alifática se encontraba sustituido en las posiciones C-24, C-30 y C-31. El espectro HMBC permitió discernir sobre qué cadena se encontraban los restos carbamoilo, mostrando la correlación $^{2,3}J_{CH}$ C-19/H-11 y C-38/H-30. El HMBC, también ha permitido confirmar la presencia del anillo 1,3,5-trisustituido al observarse $^{2,3}J_{CH}$ H-34/C-35 y H-36/C-35. Otra correlación clave ha resultado ser $^{2,3}J_{CH}$ H-36/C-30, que ha permitido saber en qué posición de la cadena alifática se hallaba el anillo 1,3,5-trisustituido. La conexión entre las dos cadenas alifáticas que determinaba la apertura del macrociclo, se confirmó mediante las siguientes correlaciones bidireccionales por HMBC: H-13/C-11, $^{2,3}J_{CH}$ H-13/C-15 y $^{2,3}J_{CH}$ H-24/C-15. Los datos espectroscópicos de RMN aparecen tabulados en la tabla 3.

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN del carbamidocilindrofridino **A** en MeOH- d_4 .

³⁹ a) Preisitsch, M.; Niedermeyer, H. J.; Heiden, S. E.; Neidhardt, I.; Kumpföller, J.; Wurster, M.; Harmrolfs, C.; Wiesner, H.; Enke, R.; Müller, R.; Mundt, S. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 106-115. b) May, D. S.; Kang, H. S.; Santarsiero, B. D.; Kronic, A.; Shen, Q.; Burdette, J. E.; Swanson, S. M.; Orjala, J. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 572-578.

| Posición | δ_C , mult. | δ_H , mult. (J en Hz) | COSY | HMBC |
|----------|-----------------------|------------------------------|------------|--------------------------------|
| 1 | 74.8, CH | 5.99, t (6) | 2 | 2,3 |
| 2 | 44.2, CH ₂ | 2.17, m | 3,1 | 1,3,4 |
| 3 | 24.2, CH ₂ | 1.66, m 1.78, m | 4,2 | 4, 5 |
| 4 | 38.4 | 1.67, m 1.78, m | 5,3 | 5, 6 |
| 5 | 64.6, CH | 3.89, m | 4,6 | 3, 4, 6, 7 |
| 6 | 39.4, CH ₂ | 1.62, m 1.79, m | 5, 7 | 5, 4, 8 |
| 7 | 27.5, CH ₂ | 1.44, m 1.34, m | 6, 8 | 5, 7, 8 |
| 8 | 27.4, CH ₂ | 1.34, m | 7, 9 | 6, 7, 9,10 |
| 9 | 33.9, CH ₂ | 1.09, m 1.37, m | 8, 10 | 8, 11, 18 |
| 10 | 39.8, CH | 1.85, m | 11, 9 | 9, 11, 18 |
| 11 | 80.6, CH | 5.23, d (6.4) | 10 | 9, 10, 12, 13, 17, 18, 19 |
| 12 | 140.4, C | - | - | - |
| 13/17 | 106.0, CH | 6.21, s | - | 11, 15 |
| 14/16 | 159.2, C | - | - | - |
| 15 | 117.2, C | - | - | - |
| 18 | 15.5, CH ₃ | 0.91, d (6.6) | 10 | 9, 10, 11 |
| 19 | 159.8, C | - | - | - |
| 20 | 75.4, CH | 5.82, t (6.2) | 21 | 21, 22 |
| 21 | 44.9, CH ₂ | 2.23, m 2.03, m | 20, 22 | 20, 22, 23 |
| 22 | 25.7, CH ₂ | 1.40, m | 21, 23 | 20, 21, 23, 24 |
| 23 | 33.2, CH ₂ | 1.52, m | 22, 24 | 21, 22, 24 |
| 24 | 35.9, CH | 3.22, m | 23, 25 | 15, 22, 23, 25, 26 |
| 25 | 34.5, CH ₂ | 1.50, m 1.44, m | 24, 26 | 15, 24, 23, 27 |
| 26 | 29.3, CH ₂ | 1.10, m | 25,27 | 24,25,27,28 |
| 27 | 28.3, CH ₂ | 1.17, m 1.38, m | 26, 28 | 25, 26, 28, 29 |
| 28 | 34.2, CH | 1.54, m 1.01, m | 27, 29 | 26, 27, 29, 30 |
| 29 | 40.0, CH | 1.73, m | 28, 30, 37 | 27, 28, 30, 31, 37 |
| 30 | 80.9, CH | 5.27, d (5.7) | 29 | 28, 29, 37, 31, 32, 36, 37, 38 |
| 31 | 144.5, C | - | - | - |
| 32/36 | 106.0, CH | 6.21, d (2.1) | - | 30, 31, 34, 33, 35 |
| 33/35 | 159.2, C | - | - | - |
| 34 | 102.4, CH | 6.15, t (2.1) | - | 32, 33, 35, 36 |
| 37 | 15.1, CH ₃ | 0.85, d (6.7) | 29 | 28, 29,30 |
| 38 | 159.6 | - | - | - |

La molécula **4** (figura 16) no había sido previamente descrita, teniendo en cuenta la nomenclatura utilizada por Preisitsch *et al.*³⁹ se la ha asignado el nombre de *carbamidocilindrofridino A*.

La configuración absoluta de **4**, se ha obtenido por comparativa de su espectro de dicroísmo circular electrónico (ECD) con datos previos de cilindrofridinos y carbamidociclofanos.^{36,39} Se observó un efecto Cotton positivo a 225 nm ($\Delta\epsilon=+2.23$) y un efecto Cotton negativo a 277.5 nm ($\Delta\epsilon=-1.11$), mostrando valores muy similares a los encontrados en los cilindrofridinos y carbamidociclofanos. Debido a la flexibilidad conformacional de los cilindrofridinos, y por consiguiente el carbamidocilindrofridino A (**4**), no es posible utilizar las constantes de acoplamiento para deducir la configuración relativa. Sin embargo, el profundo estudio biosintético llevado a cabo por Nakamura *et al.*³⁸ ha demostrado que para que ocurra el proceso de macrociclación, la posición 5, sobre la que se encuentra el cloro, tiene que presentar una configuración R, y las posiciones 10 y 29 tienen que ser S. En base a esto y puesto que el producto de macrociclación del producto **4** es el carbamidociclofano A (**1**), se puede corroborar que la configuración de la posición 24 es S. Las posiciones 11 y 30 muestran una configuración R, como se detallará posteriormente (ver apartado 3.3.5.2, Biosíntesis). En base a estos datos, la configuración absoluta propuesta para la molécula es la expuesta en la figura 16.

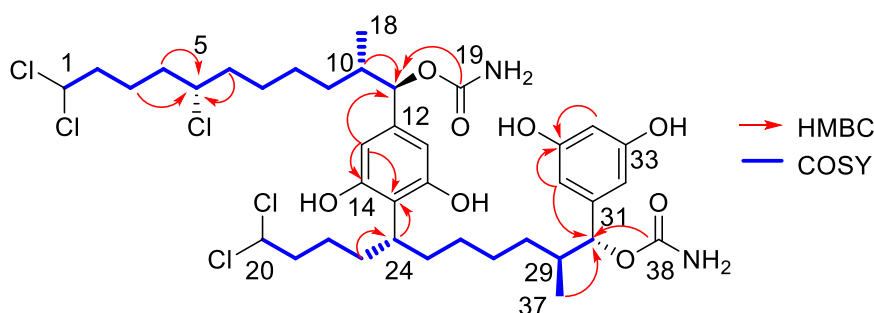


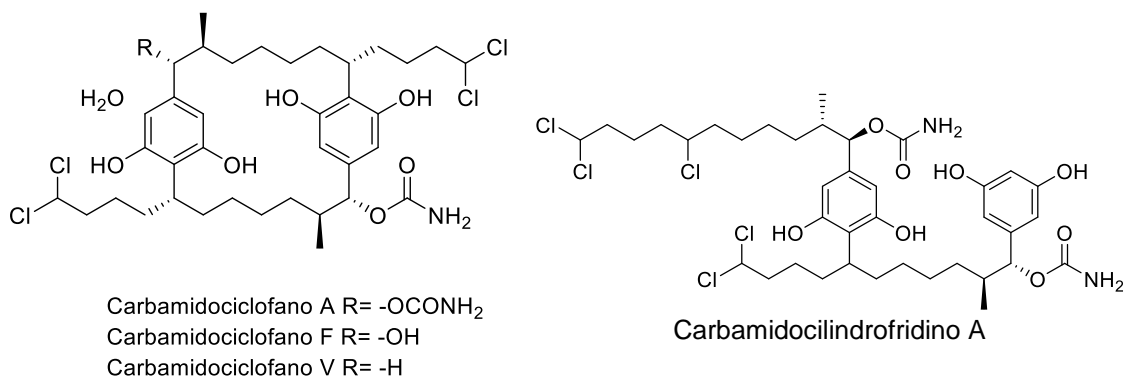
Figura 16. Configuración absoluta propuesta del carbamidocilindrofridino A.

3.3.4 ACTIVIDAD CITOTÓXICA *IN VITRO*

Una vez aislados los compuestos, se probó su actividad citotóxica *in vitro* (tabla 4).

Tabla 4. Actividad antitumoral y viabilidad celular exhibida por los metabolitos.

| | Viabilidad PBMCs | | Actividad citotóxica | |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | MTT (CC ₅₀ μM) | LDH (CC ₅₀ μM) | SK-MEL-5 (IC ₅₀ μM) | SK-MEL-28 (IC ₅₀ μM) |
| Carbamidociclofano A | 6.5 | 4.1 | 4.27 | 5.8 |
| Carbamidociclofano F | 39.5 | 25.2 | 10.4 | 13.5 |
| Carbamidociclofano V | >100 | 66.2 | 97.3 | 100 |
| Carbamidocilindrofridino A | 57.2 | 36.7 | 27.3 | 31.5 |



Los resultados mostraron que los compuestos activos, eran citotóxicos, puesto que ninguno de ellos tenía una relación adecuada de selectividad entre células cancerosas y células sanas. Este efecto era especialmente marcado en el carbamidociclofano A, que exhibía en el caso de la actividad sobre LDH una concentración citotóxica inferior a la observada en las células tumorales. En todos los casos la actividad es ligeramente más potente sobre LDH que sobre MTT, indicando que la actividad citotóxica afecta a un nivel de membrana. Sobre las células SK-MEL, se identificaron resultados de actividad similares en ambas líneas.

El análisis de relación estructura-actividad muestra que la modificación sobre el grupo carbamoilo de la posición C-1 disminuye la actividad citotóxica, observándose un aumento de CC₅₀ e IC₅₀ al pasar del grupo carbamoilo al grupo hidroxilo en el carbamidociclofano F y perdiéndose la actividad, casi por completo, al sustituirse por un protón en el carbamidociclofano V.

La apertura del macrociclo y la presencia de otro átomo de cloro en el C-5 del carbamidocilindrofridino A, también generaba una disminución de la actividad citotóxica.

3.3.5 [n.n] CICLOFANOS Y CILINDROFRIDINOS EN CIANOBACTERIAS.

3.3.5.1. Estructura química

Los ciclofanos aislados en cianobacterias pertenecen a la familia [7.7], en la que dos anillos aromáticos *para*-sustituidos están formando un puente con siete átomos de carbono. Hasta el momento, se han aislado 6 familias diferentes en función del patrón de sustitución. Los cilindrociclofanos y notosciclofanos (figura 17) fueron el primer tipo de ciclofanos identificados en bacterias *Nostocaceae* y *Cylindrospermum*.⁴⁰ Los cilindrociclofanos se caracterizan por la presencia de metilos característicos en las posiciones C-2 y C-15. Hasta ahora, con los grupos funcionales -OH, -OAc y -H como sustituyentes en las posiciones **R₁** y **R₂**. Las posiciones **R₃** y **R₄** presentan como sustituyentes los grupos

⁴⁰ a) Moore, B. S.; Chen, J. L.; Patterson, G. M.; Moore, R. E.; Brnen, L. s.; Kato, Y.; Clardy, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4061-4063. b) Moore, B. S.; Chen, J. L. Patterson, G. M. L.; Moore, R. E. *Tetrahedron*. **1992**, *48*, 3001-3006.

funcionales. $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$ y $-\text{CHCl}_2$.⁴¹ Los nostociclofanos sólo se han encontrado en cianobacterias del tipo *Nostocaceae*; se caracterizan por: la ausencia de grupos metilos en las posiciones C-2, C-15 y la presencia de un átomo de cloro en las posiciones C-3 y C-16. Los sustituyentes observados en las posiciones R_1 y R_2 pueden ser los grupos funcionales $-\text{OMe}$ y/o $-\text{OH}$.

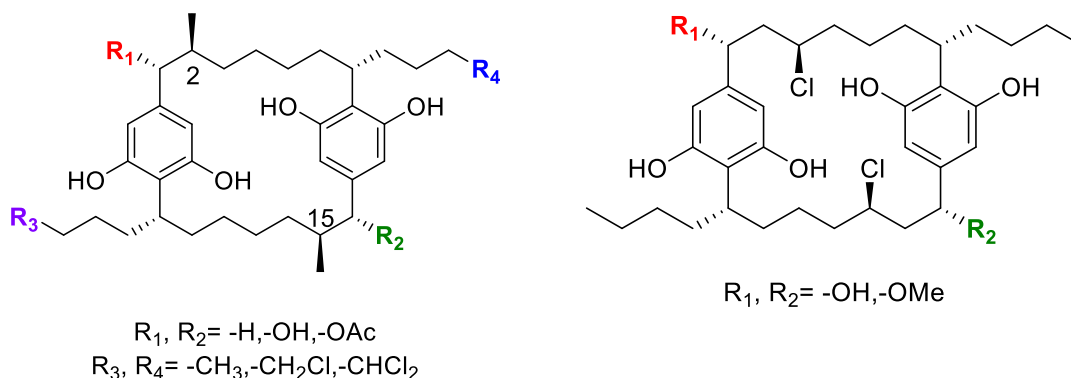


Figura 17. Estructura química general de cilindrociclofanos y nostociclofanos extraídos en cianobacterias.

Los carbamidociclofanos (figura 18) están estructuralmente relacionados con los cilindrociclofanos, si bien, como se ha visto anteriormente, siempre contienen en las posiciones C-1 y C-14 al menos un grupo carbamato.^{35,36,37} El carbamato de la posición 14 puede presentar otros sustituyentes; en R_3 se han aislado con grupos $-\text{OH}$ y $-\text{OAc}$. Además de los reseñados en la literatura, hay que añadir el nuevo carbamidociclofano descrito en esta tesis, en el cual se observa en dicha posición un $-\text{H}$ (**3**). Al igual que ocurre en los cilindrociclofanos, se han encontrado metabolitos con grupos funcionales $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$ y $-\text{CHCl}_2$ en los susituyentes $-\text{R}_1$ y $-\text{R}_2$. Adicionalmente, se ha logrado la incorporación de átomos de bromo en lugar de cloro en la cianobacteria *Nostoc* sp. CAVN2, mediante la adición al método de cultivo de KBr.³⁷

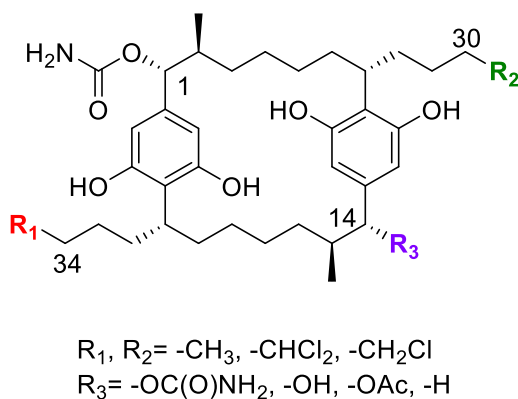


Figura 18. Estructura química general de carbamidociclofanos de cianobacterias.

Los merociclofanos (figura 19) contienen un sustituyente metilo en la posición bencílica y no presentan el grupo metilo en las posiciones C-2 y C-15, como ocurre en los nostociclofanos. Los merociclofanos han sido todos obtenidos de cianobacterias

⁴¹ Chlipala, G. E.; Sturdy, M.; Kronic, A.; Lantvit, D. D.; Shen, Q.; Porter, K.; Swanson, S. M.; Orjala, J. J. *Nat. Prod.* **2010**, 73, 1529-1537.

pertenecientes a la familia *Nostoc* sp.⁴² Esta familia puede presentar hidroxilación en los sustituyentes **R₁** y **R₂**. Entre los merociclofanos aislados cabe resaltar la estructura del merociclofano B, en el cual el uno de los anillos es una *para*-benzoquinona en lugar de un resorcinol.

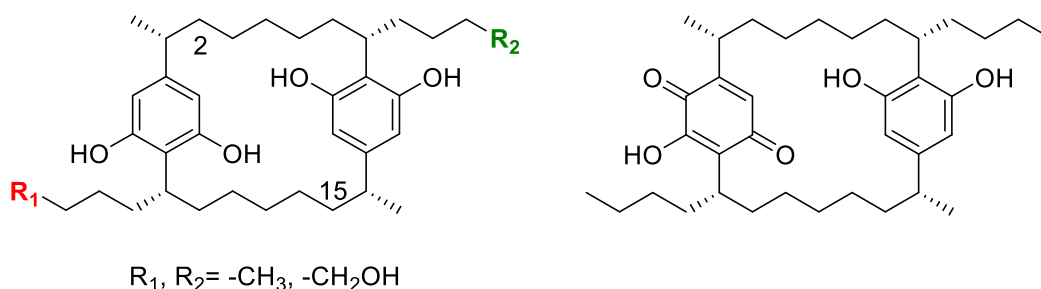
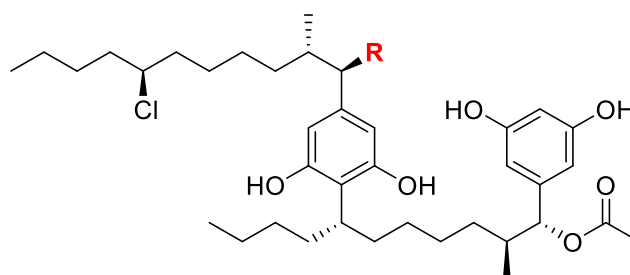


Figura 19. Estructura química general de merociclofanos extraídos en cianobacterias.

La última familia aislada de cianobacterias son precursores de los cilindrociclofanos, los cilindrofridinos (figura 20).³⁹ Todos los metabolitos de este tipo aislados hasta el momento han presentado un resto acetato esterificando a uno de los hidroxilos alifáticos, mientras que en el sustituyente **R** se han encontrado los grupos funcionales: -OH, OAc y -O-β-D-ribopiranosil. Los cilindrofridinos han resultado clave para entender cómo ocurre la macrociclación en el proceso biosintético.



R = -OH, -OAc, -O-β-D-ribopiranosil

Figura 20. Estructura química general de cilindrofridinos extraídos de cianobacterias.

3.3.5.2 Biosíntesis

Los paraciclofanos naturales han presentado gran interés desde su aislamiento por sus actividades biológicas y su interés estructural. Para entender su biosíntesis se han realizado experimentos de marcaje isotópico, estudios bioquímicos y bioinformáticos.

La primera investigación biosintética fue realizada en 1993, con marcaje isotópico, utilizando acetato [1,2-C¹³] como nutriente.⁴³ Se determinó que los paraciclofanos son biosintetizados a partir de un policétido derivado de alquilresorcinol, el cual mediante dimerización genera el correspondiente paraciclofano. También, se dedujo que el metilo en la posición β es introducido mediante la ruta del acetato.

⁴² a) Kang, H. S.; Santarsiero, B. D.; Kim, H.; Kronic, A.; Shen, Q.; Swanson, S. M.; Chai, H.; Kinghorn, A. D.; Orjala, J. *Phytochemistry*. **2012**, 79, 109-115. b) May, D. S.; Chen, W. L.; Lantvit, D. D.; Zhang, X.; Kronic, A.; Brudette, J. E.; Eustaquio, A.; Orjala, J. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 1073-1080.

⁴³ Bobzin, C.; Moore, R. E. *Tetrahedron*. **1993**, 49, 7615-7626.

Este estudio inicial resultó clave para que Baskus *et al.*⁴⁴ descubriesen los genes involucrados en la biosíntesis. Esto es debido a que los grupos metilo β son introducidos en los policétidos mediante una ruta muy conservada a lo largo de la evolución y que incluye un homólogo de hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasa (figura 21).⁴⁵

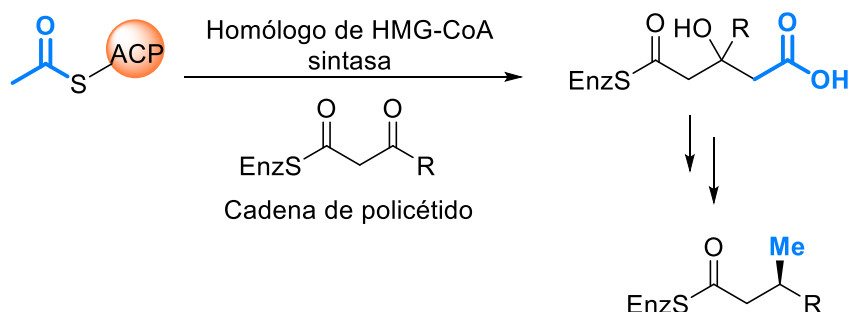


Figura 21. Reacción biosintética para la formación de metilos β en policétidos.

En base a esto, se descubrió un homólogo de HMG-CoA sintasa en *C. licheniforme* y toda la maquinaria biosintética involucrada en la formación de los paraciclofanos (*cyl A-P*). La identificación de la enzima CylI PKS tipo III confirmó la capacidad de convertir un dicétido en un alquilresorcinol precursor de la síntesis de paraciclofanos. Durante esta investigación también se descubrió que las cadenas alquílicas presentes en los paraciclofanos producidos por las cianobacterias ocurren a partir del ácido decanoico y no mediante la elongación a través de la policétido sintasa. El aislamiento de CylA y CylB, una enzima adenilante de ácidos grasos y una proteína transportadora de acilos (ACP), revelaron que la biosíntesis de cilindrociclofanos comienza con la captación de ácido decanoico. El comenzar la biosíntesis de los paraciclofanos con un ácido graso completamente lineal, requiere que, para el evento de dimerización y macrociclación, ocurra la funcionalización de un carbono inactivado. Sin embargo, durante el estudio llevado a cabo por Baskus, no se detectó el correspondiente precursor activado.

El mecanismo de dimerización fue clarificado gracias a los cilindrofridinos (figura 18).³⁹ En estos metabolitos, un átomo de cloro ocupa la posición del enlace C-C en uno de los restos alquílicos. Con la combinación de bioinformática y bioquímica, se descubrió que la enzima encargada de clorar el carbono inactivado era una nueva halogenasa (CylC).³⁸ La macrociclación ocurre mediante la enzima CylK, que a través de una alquilación de tipo Friedel-Craft genera el macrociclo con la correspondiente eliminación de cloro.³⁸ Esta es la primera vez que se describió una reacción de este tipo en la naturaleza. Se determinó también que CylP es una proteína de Rieske encargada de hidroxilar la posición bencílica.³⁸

Estos datos han llevado a la comprensión de la ruta biosintética (figura 22), la cual comienza con la conexión del ácido decanoico libre con la ACP CylB a través de la ligasa CylA. En la siguiente etapa, la halogenasa CylC clora el complejo ACP-ácido decanoico y la cloración se mantiene hasta el final de la macrociclación. El siguiente paso es una elongación con la PKS CylD, se continua con la incorporación de la funcionalización que se convertirá

⁴⁴ Nakamura, H.; Hamer, H. A.; Sirasani, G.; Baskus, E. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18518-18521.

⁴⁵ Calderone, C. T. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 845-852.

en el β -metil a través del homólogo de HMG-CoA sintasa CylF. Posteriormente, una olefina sustituida es brevemente introducida por la enoil-CoA hidratasa CylG. La PKS CylH lleva a cabo la descarboxilación, la reducción de la olefina para generar el grupo β -metilo y la incorporación de otra unidad de acetato.

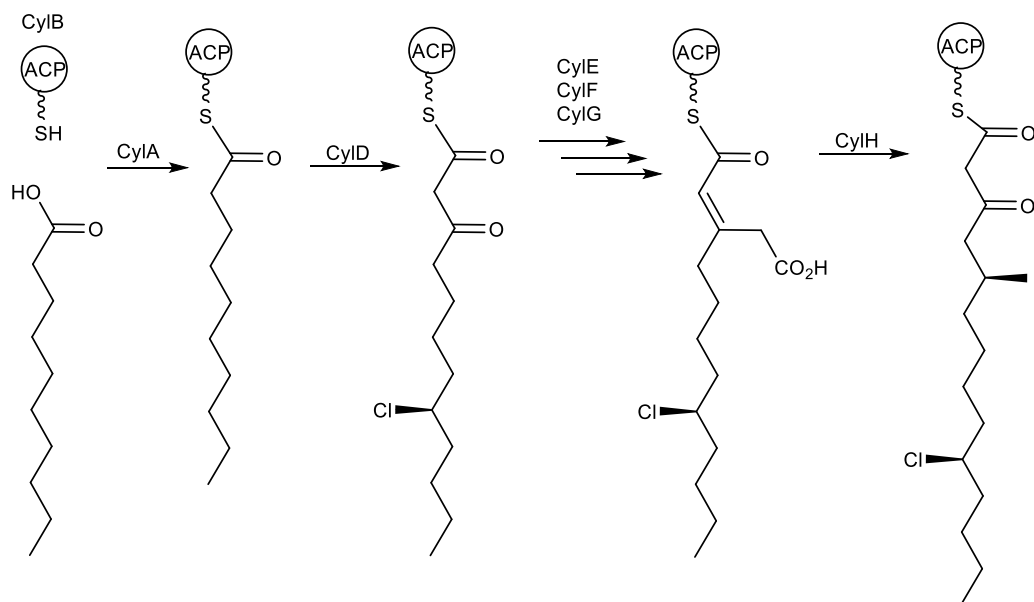


Figura 22. Etapa de elongación de paraciclofanos en cianobacterias.

La elongación finaliza con la incorporación de dos unidades más de acetato mediante la PKS CylI, la cual genera, posteriormente, la aromatización. Llegada a esta etapa de la biosíntesis, ocurre la incorporación de grupos funcionales a la cadena, como la incorporación del grupo α -hidroxi, que es introducido mediante la proteína Rieske CylP. Esto ha sido identificado y justificado con el descubrimiento del cilindrofridino A. Finalmente, la enzima CylK genera el producto de dimerización mediante una alquilación de tipo Friedel-Crafts estereoselectiva (figura 23).

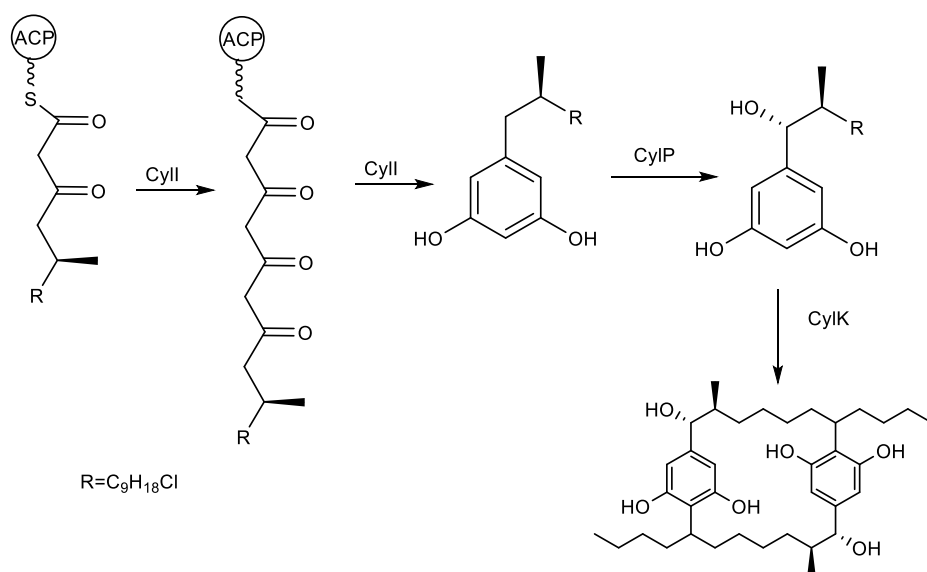


Figura 23. Etapa de aromatización y macrociclación de paraciclofanos en cianobacterias.

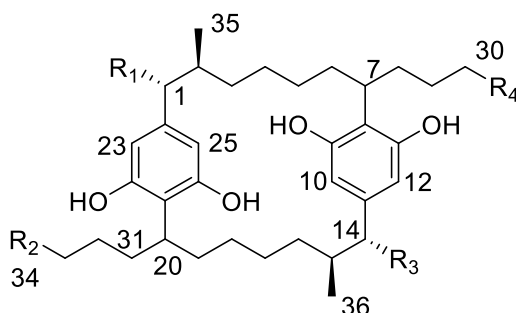
En el caso de los carbamidociclofanos, una vez transcurrida la fase de elongación promovida por CylH, actúa la halogenasa CabC que incorpora los cloros terminales en la cadena.³⁷ La incorporación del grupo carbamoilo es llevada a cabo por la enzima CabL que actúa como carbamoiltransferasa; ocurre tras el proceso de aromatización y antes de la macrociclación.³⁷ El *carbamidocilindrofredino A* (**4**), aislado en la presente tesis doctoral, corrobora experimentalmente que tanto la incorporación de los cloros terminales como los grupos carbamoilo ocurre antes de la macrociclación.

3.3.5.3. Actividad biológica

Los paraciclofanos en cianobacterias comenzaron siendo investigados por la actividad de sus extractos como antitumorales.³⁹ Los cilindrociclofanos A-F exhibieron actividad citotóxica moderada IC_{50s} 0.5-5 µg/mL y los nosotociclofanos IC_{50s} 0.5-2 µg/mL para células KB y LoVo.

En 2010 Orjala *et al.*⁴⁰ realizaron un análisis de relación estructura-actividad (tabla 5) en el que identificaron la actividad inhibitoria sobre el proteosoma 20S y las líneas celulares: HT-29, MCF-7, NCI-460 Y SF 268.

Tabla 5. Estructuras y actividades de los cilindrociclofanos identificados por Orjala *et al.*



| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | Proteosoma-20S IC ₅₀ (µm) | HT-29 IC ₅₀ (µm) |
|-----------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|---|--------------------------------|
| A | OH | CHCl ₂ | OH | CHCl ₂ | 3.93 | 2.0 |
| B | OH | CH ₂ Cl | OH | CHCl ₂ | 2.75 | 0.5 |
| C | OH | CH ₃ | OH | CHCl ₂ | 2.55 | 1.7 |
| D | OH | CH ₃ | OH | CH ₂ Cl | 27.6 | - |
| E | OH | CHCl ₂ | H | CHCl ₂ | 11.2 | 2.8 |
| F | OH | CH ₃ | H | CHCl ₂ | 22.8 | 0.9 |
| G | H | CHCl ₂ | H | CHCl ₂ | 44.8 | - |
| H | OH | CHBr ₂ | OH | CHBr ₂ | 2.23 | 0.5 |
| I | OH | CH ₃ | OH | CH ₃ | 33.9 | - |
| J | OH | CH ₃ | H | CH ₃ | 59.3 | - |
| K | H | CH ₃ | H | CH ₃ | >100 | - |

Los compuestos **A-C** tenían mayor efecto inhibitorio; la característica común que presentaban entre ellos era la presencia del resto –CHCl₂ terminal. Se observa que la

pérdida de uno de estos grupos funcionales genera una disminución significativa de la actividad biológica. La comparación entre **I-K** determina que la pérdida del –OH bencílico disminuye la actividad, llegando a desaparecer completamente en el caso de **K**. También, se realizó la investigación sobre la influencia de –Cl o –Br terminales (**A** y **H**), se concluyó que el tipo de halógeno no era relevante en la actividad. El estudio también reveló que la selectividad es baja y que la actividad citotóxica es generada por la inhibición del proteosoma 20S.

Los carbamidociclofanos han mostrado actividad moderada frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.^{35-37,39} Su actividad citotóxica está en consonancia con los valores extraídos del análisis llevado a cabo por Orjala *et al.*⁴⁰ En los carbamidociclofanos también se confirmó que la disminución de cloros en el alquilo terminal disminuye la acción citotóxica de las moléculas. El descubrimiento del carbamidociclofano V (**3**), en esta tesis doctoral, demuestra que la carencia de un grupo hidroxilo en la posición bencílica disminuye la acción citotóxica.

Los resultados obtenidos previamente para los cilindrofidrinos mostraron que el precursor abierto de los paraciclofanos no exhibía actividad citotóxica.³⁹ El hecho de que el carbamidocilindrofidrino A (**4**), aislado en la presente tesis doctoral, muestre actividad citotóxica, revela que el requerimiento necesario para la actividad es la presencia de los átomos de cloro en las posiciones 30 y 34, sin la necesidad de que el macrociclo se encuentre cerrado.

3.4 CONCLUSIONES

Una vez realizado el estudio del extracto *Cylindrospermum* sp. (GTBC-360), se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se han identificado, por primera vez, el carbamidociclofano V (**3**), y los carbamidociclofanos A (**1**) y F (**2**) previamente descritos.
- Se ha determinado la configuración absoluta mediante datos cristalográficos del carbamidociclofano A (**1**).
- Se ha obtenido por primera vez el carbamidocilindrofidrino A (**4**).
- Se ha determinado que es necesaria la sustitución de la posición C-1 en los carbamidociclofanos para presentar citotoxicidad.
- En el caso de los carbamidocilindrofidrinos, con respecto a los cilindrofidrinos, si presentan cloros en las cadenas alquílicas terminales, se sigue observando citotoxicidad.
- El carbamidocilindrofidrino A (**4**) demuestra, experimentalmente, que la incorporación de los cloros terminales y los grupos carbamoilo ocurre previamente a la etapa de macrociclación.

3.5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.5.1 TÉCNICAS GENERALES QUÍMICAS

Cromatografía en capa fina

El estudio mediante cromatografía en capa fina, se ha efectuado con cromatofolios de aluminio con gel de sílice (Merck-60 230-400 mesh) de 0.2 mm de espesor. Para la visualización de los cromatogramas se utilizó luz ultravioleta (254 nm) y ácido fosfomolibdico.

Cromatografía en columna

Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice (Merck, 230-400 mesh ASTM). El eluyente se indica en cada caso, así como las proporciones relativas de disolvente volumen/volumen.

Espectrometría de resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance DRX 500 operando a 500 MHz (^1H) o 125 MHz (^{13}C) y un Bruker Avance AV-I operando a 300 MHz (^1H) o 75 MHz (^{13}C). Los desplazamientos químicos (δ) están indicados en ppm relativas a las señales residuales de disolvente deuterado: δ_{H} 7.26 y δ_{C} 77.2 para CDCl_3 , δ_{H} 3.31 y δ_{C} 49.0 para $\text{MeOD}-d_4$, δ_{H} 2.50 y δ_{C} 39.5 para $\text{DMSO}-d_6$. Los espectros de ^{13}C RMN fueron adquiridos en un sistema de banda ancha desacoplado de protón. Las siguientes abreviaturas fueron utilizadas para describir los patrones de los picos: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuartete), quint (quintete), sext (sextuplete), sept (septuplete), m (multiplete) y br (señal ancha).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se registró en un espectrómetro QSTAR XL de cuadrupolo con TOF, utilizando técnicas de impacto electrónico (EI+), a 70 e. V., y electrospray (ESI+).

Rotaciones específicas

Los valores de rotación óptica ($[\alpha]_{\text{D}}$) se han medido a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin-Elmer 241C. En cada caso se indica el disolvente y la concentración (mg/mL) utilizados.

Disolventes y reactivos

Los disolventes y reactivos utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales y utilizados sin previa purificación.

3.5.2 TÉCNICAS GENERALES BIOLÓGICAS

Cultivo celular

En este estudio se utilizaron tres líneas humanas celulares: SK-MEL-5, SK-MEL-28 y las células no tumorales PBMCs. Todas las líneas celulares fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATTC). Las células fueron cultivadas en un medio específico de acuerdo a las recomendaciones de la ATTC. Los PBMCs fueron obtenidos de sangre pura, mediante centrifugación por densidad de gradiente utilizando Lymphoprep (Terncell Technologies, Vancouver, BC), siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los cultivos celulares fueron incubados a 37°C bajo condiciones hipóxicas (1% O₂).

Ensayo de citotoxicidad

La viabilidad celular de las líneas celulares (SK-MEL-5, SK-MEL-28 y PBMCs) fue determinada mediante los ensayos MTT y LDH. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2x10⁴ células/pocillo. Posteriormente, fueron incubadas durante 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂. Tras este periodo, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos objeto de estudio bajo condiciones hipóxicas (1% O₂).

Ensayo de citotoxicidad MTT: Tras 72 h de incubación, un volumen de 20 µL de PBS conteniendo 4 mg/mL de MTT fue añadido a cada pocillo. Después de esto, las placas fueron incubadas durante 4 h., antes de ser centrifugadas a 1500 r.p.m. a 4°C durante 10 min, seguidamente se desechó el sobrenadante. Tras esto, se añadió DMSO (150 µL) a cada pocillo, se agitaron vigorosamente las placas para asegurar la completa disolución. La absorción de luz (OD) fue recogida en un lector espectrofotométrico ELISA (SpectraMax® i3, Molecular Devices, CA, USA) a 590 nm.

Ensayo de citotoxicidad LDH: Tras 72 h de tratamiento con el compuesto, 100 µL de sobrenadante del cultivo fue recogido e incubado en la mezcla de reacción correspondiente al kit LDH (Innoprot Company, Bizkaia, Spain). Tras 30 minutos, se detuvo la reacción añadiendo HCl 1N, y se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector espectrofotométrico ELISA (SpectraMax® i3, Molecular Devices, Ca, UA).

3.5.3 RECOLECCIÓN DE MUESTRA Y CULTIVO

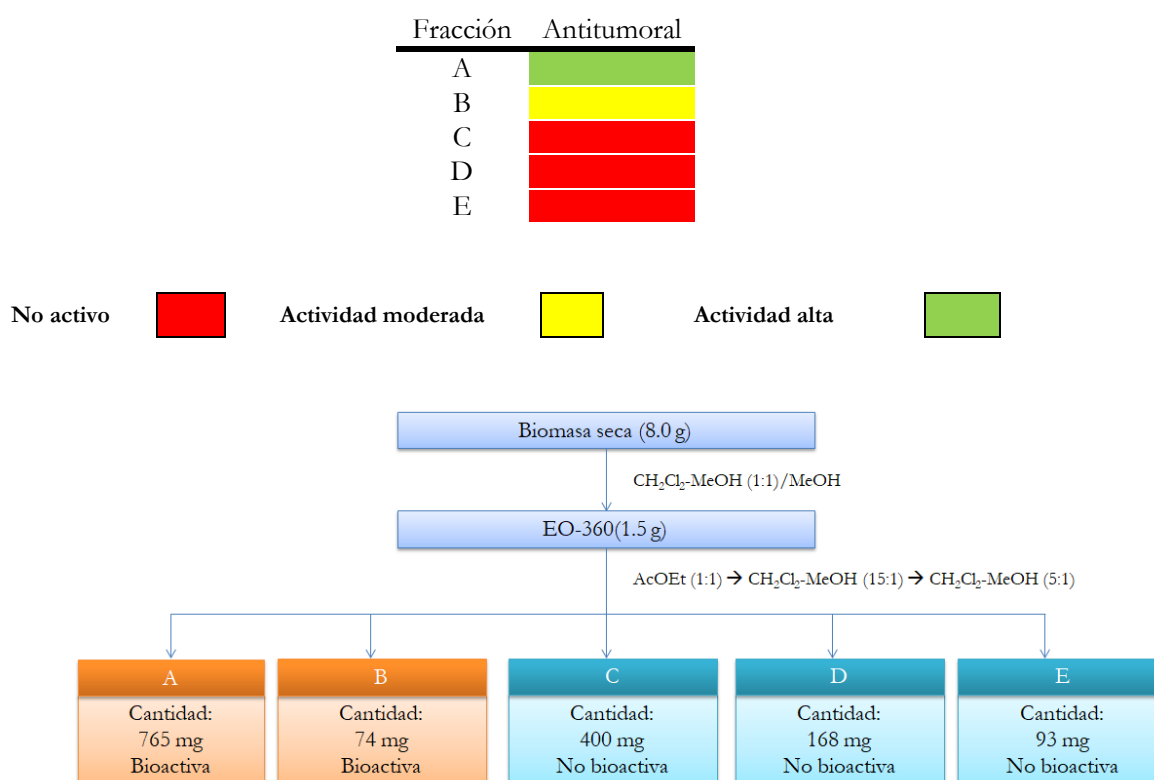
Cylindrospermum sp. (GTBC-360) fue recolectada en el parque nacional de Garajonay, La Gomera, y crecida en condiciones axénicas en Valoralia I más D. Las cianobacterias fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer de 2 L. de capacidad con medio de cultivo BG-110. Los cultivos fueron crecidos con burbujeo continuo de aire e incubados a 23 ± 1 °C. El cultivo fue exclusivamente iluminado con luz ambiental. La recolección de biomasa se realizó cada 21 días, la biomasa obtenida fue centrifugada y posteriormente liofilizada.

3.5.4 EXTRACCIÓN, FRACCIONAMIENTO Y AISLAMIENTO.

3.5.4.1 Fraccionamiento inicial

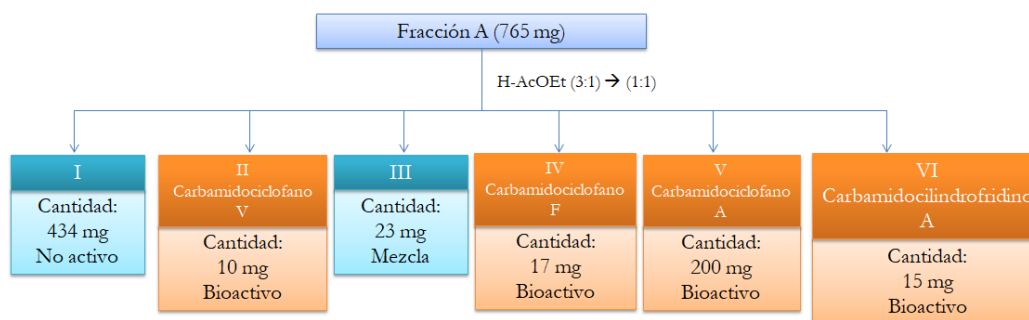
La biomasa seca liofilizada (8.0 g.) fue extraída mediante agitación a temperatura ambiente con una mezcla 1:1 de CH_2Cl_2 -MeOH (3 x 1L) y, posteriormente, con MeOH (3 x 500 mL). Los extractos fueron concentrados mediante evaporación a presión reducida para obtener un aceite gomoso de color verde de extracto orgánico EO-360 (1.5 g).

El fraccionamiento inicial se realizó mediante cromatografía en columna con gel de sílice utilizando como fase móvil un gradiente que comenzó con AcOEt, seguido de CH_2Cl_2 -MeOH (15:1) y se finalizó con CH_2Cl_2 -MeOH (5:1). Se obtuvieron 5 fracciones A-E que fueron sometidas a bioensayos, los resultados se muestran a continuación:



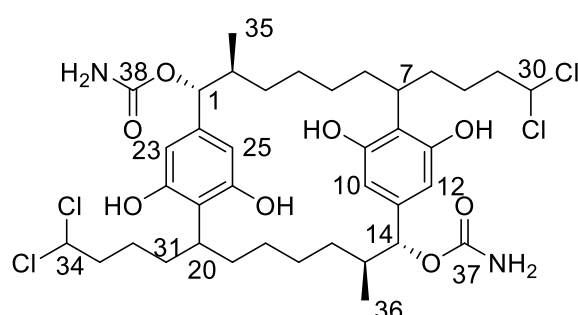
3.5.4.2 Fraccionamiento de A

La fracción A (765 mg) fue sometida a una separación mediante cromatografía en columna de sílica gel, utilizando como eluyentes hept-AcOEt (3:1) y hept-AcOEt (1:1), obteniéndose seis fracciones de las cuales se aislaron cuatro metabolitos puros que eran las responsables de la actividad antitumoral.



3.5.5 ASIGNACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS NATURALES

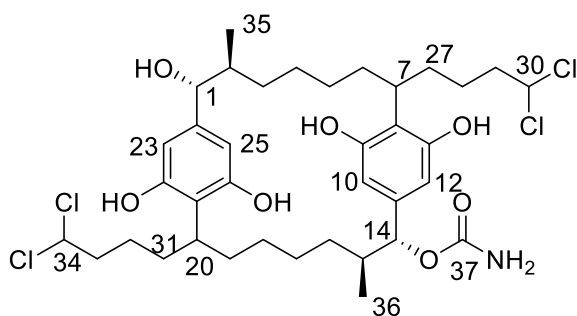
Carbamidociclofano A (1)



RMN- ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 4.83 (d, 2H, $J = 9.6\text{ Hz}$, H-1/H-14), 1.76-1.68(m, 2H, H-2/H-15), 0.79(m, 2H, H-3a/H-16a), 0.68 (m, 2H, H-3b/H-16b), 1.44 (m, 2H, H-4a/H-17a), 0.86 (m, 2H, H-4b/H-17b), 0.95 (m, 2H, H-5a/H-18a), 0.74 (m, 2H, H-5b/H-18b), 2.06 (m, 2H, H-6a/H-19a), 1.34 (m, 2H, H-6b/H-19b), 3.23 (m, 2H,

H-7/H-20), 6.20 (s, 2H, H-10/H-23), 6.14 (s, 2H, H-12/H-25), 2.04 (m, 2H, H-27a/H-31a), 1.54 (m, 2H, H-27b/H-31b), 1.37 (m, 4H, H-28/H-32), 2.16 (m, 2H, H-29a/H-33a), 2.09 (m, 2H, H-29b/H-33b), 5.82 (t, 1H, $J = 5.6\text{ Hz}$, H-30/H-34), 1.00 (d, 6H, $J = 6.4\text{ Hz}$, H-35/H-36). **RMN- ^{13}C** (125 MHz, CD_3OD): δ 83.5 (C-1/C-14), 40.4 (C-2/C-15), 34.5 (C-3/C-16), 29.6 (C-4/C-17), 30.4 (C-15/C-18), 35.3 (C-6/C-19), 36.4 (C-7/C-20), 117.3 (C-8/C-21), 158.8 (C-9/C-22), 105.2 (C-10/C-23), 140.1 (C-11/C-24), 109.4 (C-12/C-25), 157.0 (C-13/C-26), 33.7 (C-27/C-31), 25.8 (C-28/C-32), 45.1 (C-29/C-33), 75.3 (C-30/C-34), 156.4 (C-37/C-38), 16.6 (C-35/C-36). **HRESIMS** $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 829.2526 (calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_8\text{NaCl}_4$ 806.2526). $[\alpha]_D^{22} = -1.2$ (c 0.4, MeOH).

Carbamidociclofano F (2)

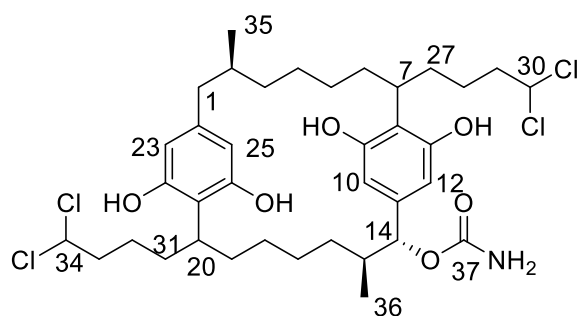


RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 3.75 (d, 1H, $J = 9.6\text{ Hz}$, H-1), 1.55 (m, 1H, H-2), 0.63 (m, 1H, H-3a), 0.74 (m, 1H, H-3b), 1.44 (m, 2H, H-4a/H-17a), 0.83 (m, 2H, H-4b/H-17b), 0.95 (m, 2H, H-5a/H-18a), 0.72 (m, 2H, H-5b/H-18b), 1.33 (m, 4H, H-6/H-19), 3.20 (m, 2H, H-7/H-20), 6.21 (br, 1H, H-10), 6.13 (br, 1H, H-12), 4.81 (d, 1H, $J = 10.3\text{ Hz}$, H-14), 1.73 (m, 1H,

H-15), 0.71 (m, 1H, H-16a), 0.79 (m, 1H, H-16b), 6.25 (s, 1H, H-23), 6.08 (s, 1H, H-25), 1.51 (m, 2H, H-27a/H-31a), 2.04 (m, 2H, H-27b/H-31b), 1.36 (m, 4H, H-28/H-32), 2.06 (m, 2H, H-29a/H-33a), 2.20 (m, 2H, H-29b/H-33b), 5.82 (t, 2H, $J = 6.2\text{ Hz}$, H-30a/

H-34a), 5.83 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-30b/H-34b), 1.06 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, H-35), 1.00 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, H-36), **RMN- C^{13}** (75 MHz, CD_3OD): δ 81.7 (C-1), 42.0 (C-3), 35.2 (C-4/C-17), 29.7 (C-4), 29.8 (C-17), 30.5 (C-5), 30.6 (C-18), 35.3 (C-6/C-19), 36.3 (C-7), 36.4 (C-20), 117.4 (C-8), 158.8 (C-9), 105.2 (C-10), 140.1 (C-11), 109.4 (C-12), 157.0 (C-13), 83.5 (C-14), 40.4 (C-15), 34.5 (C-16), 116.7 (C-21), 158.9 (C-22), 105.0 (C-23), 144.2 (C-24), 108.8 (C-25), 157.1 (C-26), 33.7 (C-27), 33.8 (C-31), 25.7 (C-28), 25.8 (C-32), 45.0 (C-29), 45.2 (C-33), 75.3 (C-30), 75.4 (C-34), 17.0 (C-36), 16.6 (C-35), 159.8 (C-37). **HRESIMS** $[M+Na]^+$ m/z 786.2489 (calculado para $C_{37}H_{53}NO_7NaCl_4$ 786.2465). $[\alpha]_D^{22} = -3.2$ (c 0.2, MeOH).

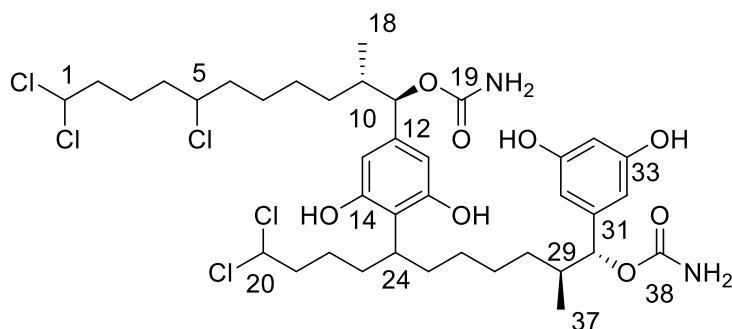
Carbamidociclofano V (3)



RMN- H^1 (500 MHz, CD_3OD): δ 2.60 (dd, 1H, $J = 3.7, 13.0$ Hz, H-1a), 1.83 (t, 1H, $J = 13.0$ Hz, H-1b), 1.53 (m, 2H, H-2), 0.65 (m, 1H, H-3a), 1.03 (m, 1H, H-3b), 0.83 (m, 2H, H-4a/17a), 1.44 (m, 2H, H-4b/17b), 0.80 (m, 2H, H-5a/18a), 0.72 (m, 2H, H-5b/18b), 2.02 (m, 2H, H-6a/19a), 1.34 (m, 2H, H-6b/19b), 3.18 (m, 2H, H-7/H-20),

6.21 (s, 1H, H-10), 6.13 (s, 1H, H-12), 4.83 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz, H-14), 1.73 (m, 1H, H-15), 0.71 (m, 1H, H-16a), 0.79 (m, 1H, H-16b), 6.03 (s, 1H, H-23), 6.00 (s, 1H, H-25), 2.07 (m, 2H, H-27a/31a), 2.18 (m, 2H, H-27b/31b), 1.38 (m, 4H, H-28/32), 2.07 (m, 2H, H-29a/33a), 2.18 (m, 2H, H-29b/33b), 5.83 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, H-30/34), 0.94 (d, 1H, $J = 6.5$ Hz, H-35), 0.99 (d, 1H, $J = 6.4$ Hz, H-36) **RMN- C^{13}** (125 MHz, CD_3OD): δ 45.8 (C-1), 36.8 (C-2), 36.6 (C-3), 29.6 (C-4), 30.0 (C-17), 30.4 (C-5), 30.6 (C-18), 35.5 (C-6), 35.3 (C-19), 36.2 (C-7), 36.5 (C-20), 117.5 (C-8), 158.3 (C-9), 105.3 (C-10), 140.0 (C-11), 109.4 (C-12), 157.0 (C-13), 83.5 (C-14), 40.4 (C-15), 34.5 (C-16), 115.0 (C-21), 158.7 (C-22), 107.9 (C-23), 144.2 (C-24), 110.0 (C-25), 157.1 (C-26), 33.7 (C-27/31), 25.8 (C-28/32), 45.0 (C-29), 45.1 (C-33), 75.3 (C-30/34), 20.8 (C-35), 16.5 (C-36). **HRESIMS** $[M+Na]^+$ m/z 770.2521 (calculado para $C_{37}H_{53}NO_7NaCl_4$ 770.2465). $[\alpha]_D^{22} = -5.7$ (c 0.3, MeOH).

Carbamidocilindrofridino A (4)



RMN- H^1 (500 MHz, CD_3OD): δ 5.99 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-1), 2.17 (m, 2H, H-2), 1.66 (m, 1H, H-3a), 1.78 (m, 1H, H-3b), 1.67 (m, 1H, H-4a), 1.78 (m, 1H, H-4b), 3.89 (m, 1H, H-5), 1.62 (m, 1H, H-6a), 1.79 (m, 1H, H-6b), 1.44 (m, 1H,

H-7a), 1.34 (m, 1H, H-7b), 1.34 (m, 2H, H-8), 1.09 (m, 1H, H-9a), 1.37 (m, 1H, H-9b), 1.85 (m, 1H, H-10), 5.23 (d, 1H, $J = 6.4$ Hz, H-11), 6.21 (s, 1H, H-13/17), 0.91 (d, 3H,

J= 6.6Hz, H-18), 5.82 (t, 1H, J= 6.2 Hz, H-20), 2.23 (m, 1H, H-21a), 2.03 (m, 1H, H-21b), 1.40 (m, 2H, H-22), 1.52 (m, 2H, H-23), 3.22 (m, 1H, H-24), 1.50 (m, 1H, H-25a), 1.44 (m, 1H, H-25b), 1.10 (m, 2H, H-26), 1.17 (m, 1H, H-27a), 1.38 (m, 1H, H-27b), 1.54 (m, 1H, H-28a), 1.01 (m, 1H, H-28b), 1.73 (m, 1H, H-29), 5.27 (d, 1H, J= 5.7 Hz, H-30) 6.21 (d, 2H, J= 2.1Hz, H-32/36), 6.15 (t, 1H, J= 2.1Hz, H-34), 0.85 (d, 3H, J= 6.7 Hz, H-37), **RMN- C^{13}** (125 MHz, CD_3OD): δ 74.8 (C-1), 44.2 (C-2), 24.2 (C-3), 38.4 (C-4), 64.6 (C-5), 39.4 (C-6), 27.5 (C-7), 27.4 (C-8), 33.9 (C-9), 39.8 (C-10), 80.6 (C-11), 140.4 (C-12), 106.0 (C-13/17), 159.2 (C-14/16), 117.2 (C-15), 15.5 (C-18), 159.8 (C-19), 75.4 (C-20), 44.9 (C-21), 25.7 (C-22), 33.2 (C-23), 35.9 (C-24), 34.5 (C-25), 29.3 (C-26), 28.3 (C-27), 34.2 (C-28), 40.0 (C-29), 80.9 (C-30), 144.5 (C-31), 106.0 (C-32/36), 159.2 (C-33/35), 102.4 (C-34), 15.1 (C-37), 159.6 (C-38) **HRESIMS** $[M+Na]^+$ m/z 865.2290 (calculado para $C_{38}H_{54}N_2O_8NaCl_4$ 865.2293). $[\alpha]_D^{22}=+27.4$ (c 1.1, MeOH).

**CAPÍTULO 4:
SÍNTESIS DE ANÁLOGOS
DE MACAMIDAS
NATURALES Y ESTUDIO
DE ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA**

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 LA INFLAMAMACIÓN

La inflamación es una respuesta biológica innata e inespecífica frente a las agresiones del medio. La respuesta inflamatoria (figura 1) ocurre sólo en tejidos conectivos vascularizados; surge con el fin defensivo de aislar, destruir el agente inflamatorio y reparar el tejido u órgano dañado.^{1,2} Una vez que ocurre el daño inicial, se estimula la liberación de mediadores químicos en los mastocitos del tejido conectivo.³

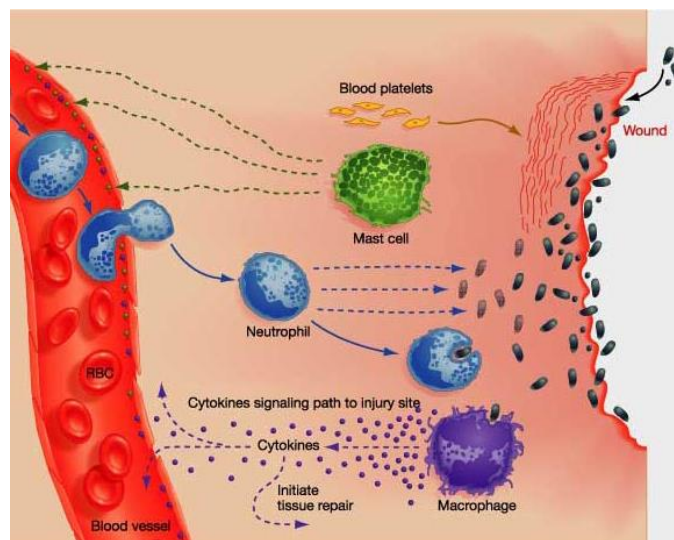


Figura 1. Esquema básico de la respuesta inflamatoria ante una agresión.

4.1.2 MEDIADORES

Los mediadores bioquímicos producidos durante la inflamación son los encargados de intensificar y propagar la respuesta inflamatoria. No suelen presentar tamaño molecular elevado (figura 2), y consisten en: lípidos, aminoácidos modificados y pequeñas proteínas. Contienen información destinada a las células, las cuales son capaces de utilizarla gracias a receptores específicos en la membrana plasmática.⁴

¹ Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. *Cellular and Molecular Immunology*. (2005) 5th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.

² Whicher, J. T.; Evans, S. W. (1992) *Biochemistry of Inflammation*. 1st ed. Springer-Science+Business Media, B.V.

³ Medzhitof, R. *Nature*. 2008, 454, 428-35.

⁴ Sacca, R.; Cuff, C.A.; Ruddle, N.H. *Curr. Opin. Immunol.* 1997, 9, 851-7.

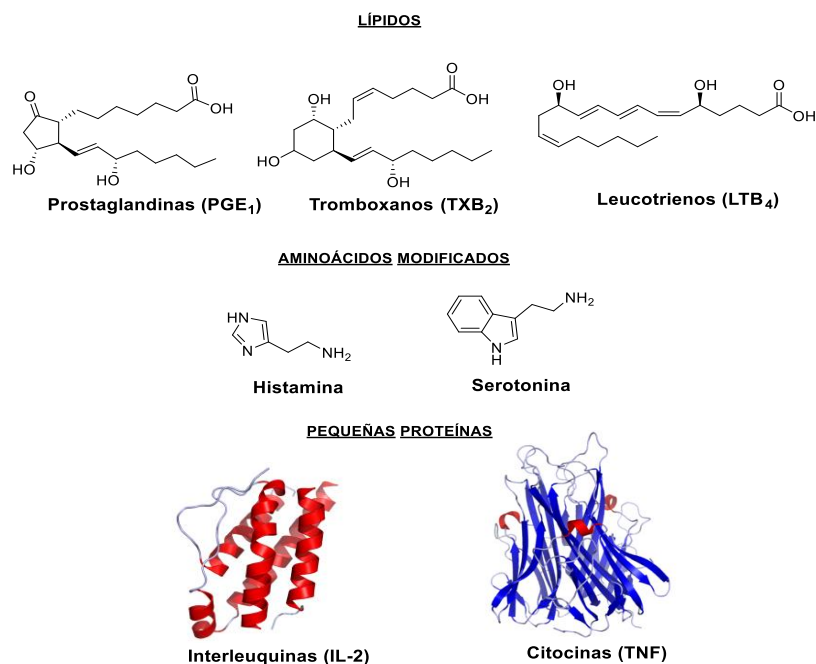


Figura 2. Estructura química de algunos mediadores relevantes.

4.1.3 INFLAMACIÓN E IMPACTO SOCIAL

La inflamación es beneficiosa cuando aparece de manera localizada. No obstante, cuando resulta no localizada y crónica, se ha demostrado que tiene relación con un gran número de enfermedades y afecciones.⁵

Debido a la interacción de la inflamación con factores neuronales, cognitivos o dietéticos, es sabido la repercusión negativa que puede tener en la vida de las personas.⁶

Por todo esto, conocer cuándo y cómo reducir la inflamación en los casos asociados a factores de riesgo, tiene que ser una prioridad, tanto a nivel científico como social.⁷

4.1.4 ANTIINFLAMATORIOS

La respuesta que se ha dado para aliviar o disminuir las afecciones inflamatorias han sido los anti-inflamatorios. Estos medicamentos actúan impidiendo o inhibiendo la biosíntesis de agentes mediadores, principalmente, eicosanoides o derivados del ácido araquidónico. Existen dos grandes familias de antiinflamatorios: no esteroideos (AINE) y esteroideos (AIE).

Los AINE actúan inhibiendo la enzima ciclooxigenasa (COX), encargada de la biosíntesis de prostaglandinas en el organismo.⁸ En la figura 3 quedan reflejadas las familias de AINE que presentan mayor relevancia terapéutica.

⁵ Couzin-Frankel, J. *Science*. **2010**, 330, 1621.

⁶ Irwin, M. R.; Cole, S. W. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, 11, 625-632.

⁷ Slavich, G. M. *Brain Behav. Immun.* **2015**, 45, 13-14.

⁸ Baek S.J., Wilson L.C., Lee C.H., Eling T.E. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002**, 301, 1126-31.

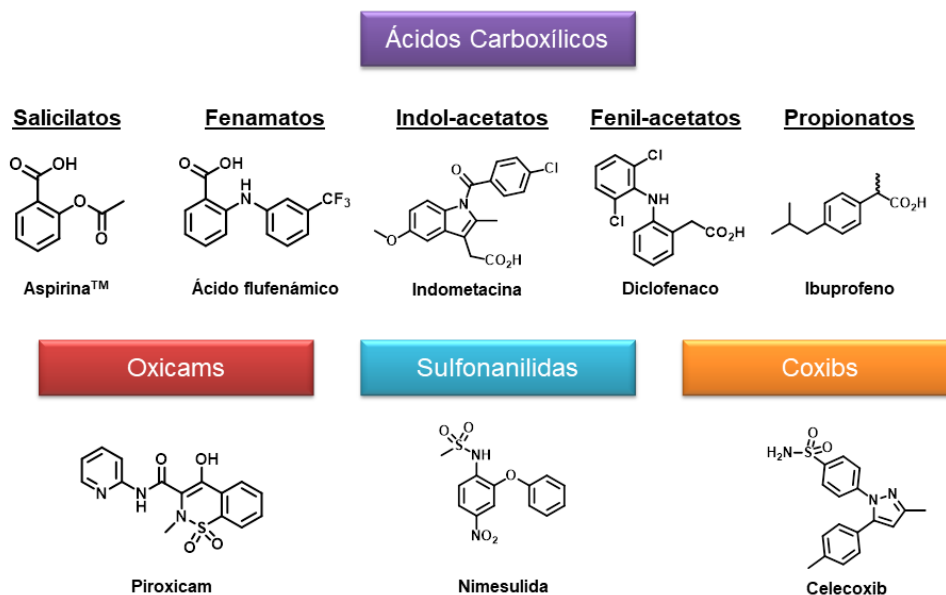


Figura 3. Familias de AINE más importantes clínicamente.

Debido a la inhibición sobre COX-1, las familias de los ácidos carboxílicos, oxicams y sulfonanilidas, generan efectos adversos inherentes a su actividad farmacológica. Entre los efectos gastrointestinales más frecuentes destacan: esofagitis, úlceras, lesiones tóxicas y gastroenteritis.⁹

La familia de los coxibs fue un punto de inflexión en el desarrollo de nuevos AINE, a causa de que actuaban selectivamente sobre COX-2, la cual es expresada, únicamente, mediante diversos mediadores inflamatorios (interferón, IL-1, TNF- α , etc.) y no está relacionada con la protección de la mucosa gastrointestinal.¹⁰ El principal problema que presentan ha sido derivado de los efectos secundarios graves que producen, relacionados con el sistema cardiovascular.¹¹

El nacimiento de los glucocorticoides produjo una gran revolución en el campo de la inflamación y las enfermedades reumáticas. En 1950, Philip Showalter Hench fue galardonado con el premio Nobel de medicina gracias al descubrimiento de su actividad antiinflamatoria.

Como modelo para desarrollar esta familia de antiinflamatorios, se ha utilizado el cortisol (figura 4) y se han realizado modificaciones estructurales para mejorar su perfil farmacológico.

⁹ Hawkey CJ. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2001**, 15, 801-820.

¹⁰ Fung, H.B.; Kirschenbaum, H. L. *Clin. Ter.* **1999**, 21, 1131-1157.

¹¹ Rainsford, K. D. *Inflammopharmacology.* **2005**, 13, 331-341.

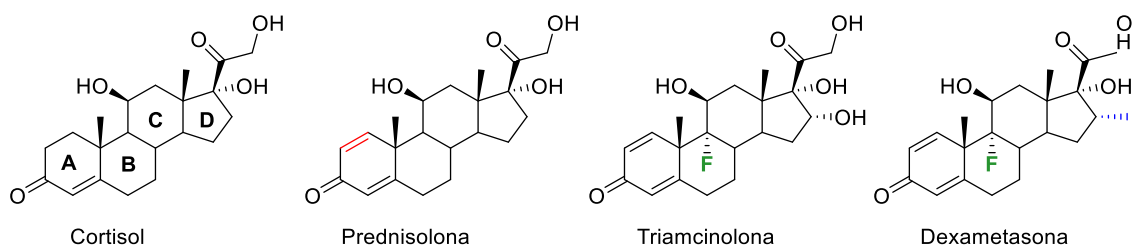


Figura 4. Modificaciones estructurales del cortisol.

A pesar de ser los antiinflamatorios más potentes conocidos, su uso clínico está muy limitado debido a sus numerosos efectos secundarios, entre los que se encuentran: desarrollo de glaucoma y cataratas, hipertensión, insuficiencia cardíaca, osteoporosis, psicosis, depresión, inmunosupresión, etc.¹²

4.1.5 NECESIDAD DE NUEVOS AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

Aunque el arsenal terapéutico para los problemas inflamatorios es muy amplio, se ha visto que el perfil exhibido, tanto por los AINE como por los glucocorticoides, presenta un margen de mejora amplio para poder paliar los efectos secundarios generados por ambas familias.

Se han producido avances significativos, tanto en la comprensión de la biología celular como en los mediadores que influyen en la respuesta antiinflamatoria, entendiéndose cómo ocurre la producción de los mismos. Este hecho, junto con el desarrollo en los procesos biotecnológicos, ha llevado a uno de los tratamientos más revolucionarios en las enfermedades relacionadas con la inflamación: las terapias anti-citocinas. Las dos dianas principales que se han utilizado en este tipo de terapias han sido la citocina TNF- α e IL-1.¹³

4.1.6 TNF- α

TNF- α es una potente citocina pro-inflamatoria generada por los macrófagos, y está involucrada en la propagación de la inflamación en la fase aguda. TNF- α tiene diversas funciones inmunoregulatorias como: inhibición de la replicación viral, carcinogénesis, inducción de apoptosis, inflamación, inicio de respuesta defensiva contra la sepsis, etc.¹⁴ La falta de regulación en la producción de TNF- α , tiene repercusión en diferentes enfermedades inflamatorias, incluyendo: artritis reumatoide, asma, psoriasis, etc. La sobreproducción de TNF- α está asociada con problemas de inflamación, tanto aguda como crónica.¹⁵

¹² Poetker, D. M.; Reh, D. D. *Otolaryngol. Clin. North. Am.* **2010**, *43*, 753-768.

¹³ a) Hansbro, P. M.; Kaiko, G. E.; Foster, P. S. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 81-95. b) Maini, R. N.; Taylor, P. C. *Annu. Rev. Med.* **2000**, *51*, 207-229.

¹⁴ Chistiakov, D. A.; Melnichenko, A. A.; Grechko, A. V.; Myasoedova, V. A.; Orekhov, A. N. *Exp. Mol. Pathol.* **2018**, *104*, 114-124.

¹⁵ Chaparro, M.; Guerra, I.; Muñoz-Linares, P. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *35*, 971-986.

4.1.7 MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)

Ante la necesidad de agentes antiinflamatorios que mejoren el perfil farmacológico, mediante la reducción de efectos adversos, nuestro grupo de investigación lleva años analizando diferentes extractos naturales para la búsqueda de nuevas sustancias activas.

Entre las plantas que se han trabajado resalta la Mashua, *Tropaeolum tuberosum*, (figura 5) un tubérculo procedente de la región Andina.



Figura 5. Distintas variedades de *T. tuberosum*.

T. tuberosum ha sido utilizada en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones.^{16,17} Gracias a estas propiedades, *T. tuberosum* se planteaba como una excelente fuente natural para analizar los metabolitos responsables de sus actividades.

4.1.8 MACAMIDAS

Entre las moléculas aisladas en *T. tuberosum* destacaron por sus propiedades antiinflamatorias, las macamidas (figura 6).

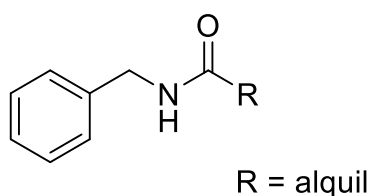


Figura 6. Estructura química general de las macamidas.

Las macamidas son unos metabolitos secundarios obtenidos de otro tubérculo de la región Andina, la Maca (*Lepidium meyenii*).¹⁸ Constan de un grupo bencilamina formando un enlace amida con un ácido graso de cadena larga C₁₄₋₂₀, el cuál puede contener insaturaciones en su cadena alquílica. Las actividades biológicas descritas hasta el momento

¹⁶ Brack, A. *Diccionario enciclopédico de plantas útiles de Perú*. Centro de estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas, Lima, Perú.

¹⁷ Cadima, F. X. *Botánica económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. **2006**, 347-369.

¹⁸ Zheng BL, He K, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, Yan SJ, Qien LC, Zheng QY. *Urology*. **2000**, 55, 598-602.

son: la inhibición moderada de la enzima ácido graso hidrolasa de los mamíferos (FAAH),¹⁹ y los receptores cannabinoides.²⁰

En el estudio fitoquímico, se encontraron una serie de macamidas descritas, anteriormente, junto con dos nuevos análogos que no habían sido identificadas previamente en plantas (figura 7).²¹

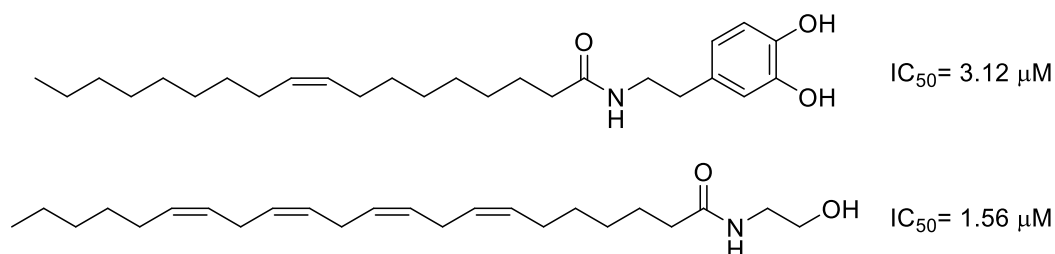


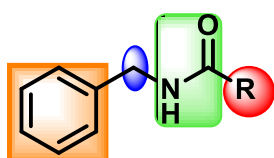
Figura 7. Estructura química de los metabolitos descubiertos en macamidas.

Debido a la actividad inhibitoria de TNF- α y las propiedades antiinflamatorias que podían presentar las macamidas, se decidió realizar un estudio sistemático de farmacomodulación, para conocer su alcance terapéutico.

4.2 OBJETIVOS

Con el fin de mejorar el perfil farmacológico e investigar la relevancia de los análogos de macamidas como potenciales agentes antiinflamatorios, se propusieron los siguientes objetivos:

- 1) Síntesis química de análogos estructurales, mediante diversas modificaciones sencillas en las posiciones consideradas de mayor trascendencia.



R = cadena alquílica

- Influencia de la cadena alquílica.
- Influencia del enlace amida.
- Influencia de la posición bencílica.
- Influencia del anillo aromático.

- 2) Estudio de la actividad sobre la producción de la diana TNF- α como mediador de la actividad antiinflamatoria.

¹⁹ Wu, H.; Kelley, C. J.; Pino-Figueroa, A.; Vu, H. D.; Timoty, J. M. *Bioorgan Med Chem*, **2013**, 21, 5188-5197.

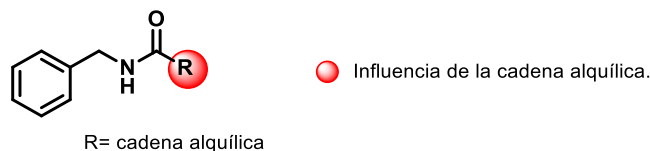
²⁰ Esparza, E.; Hadzich, A.; Kofer, W.; Mithöfer, A.; Cosio, E. G. *Phytochemistry*. **2015**, 116, 138-148.

²¹ Apaza, T. L.; Tena, P. V.; Serban, M. A.; Navarro, A. M. J.; Rumero, A. J. *Ethnopharmacol*. **2019**, 235, 199-205.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

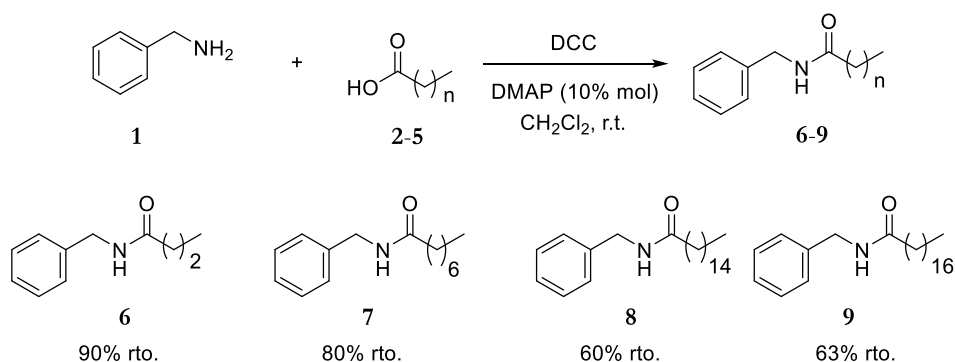
4.3.1 INFLUENCIA DE LA CADENA ALQUÍLICA

Para llevar a cabo los objetivos, se comenzó analizando la importancia de la longitud y el grado de insaturación en la cadena alquímica.



4.3.1.1 Síntesis de bencilamidas con distinta longitud de cadena

Como punto de partida, se sintetizaron bencilamidas con distinta longitud de cadena. Para ello, se utilizaron las condiciones del esquema 1.



Esquema 1. Preparación de bencilamidas (**6-9**) mediante reacción de Steglich.

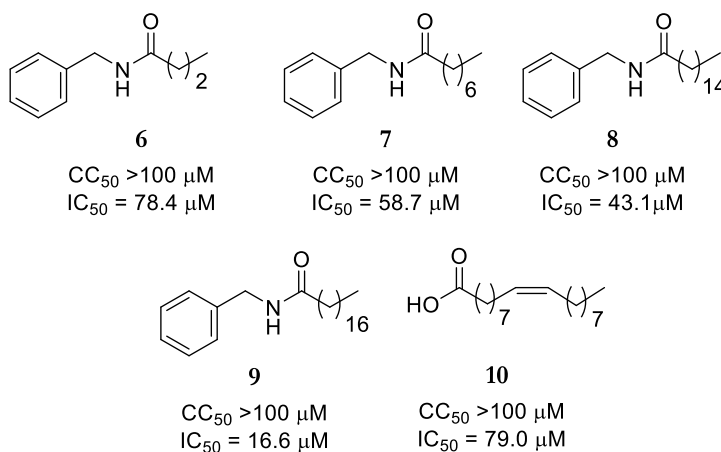
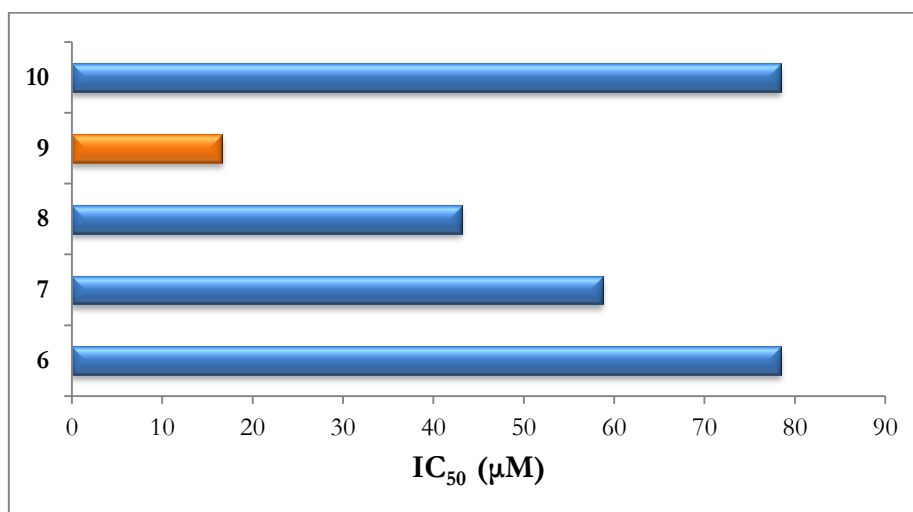
Para llevar a cabo la síntesis de la batería de compuestos se utilizó la reacción de Steglich;²² siguiendo esta estrategia de trabajo se utilizaron ácidos carboxílicos saturados con diferente longitud de cadena. La reacción se llevó a cabo con rendimientos que varían entre moderados y buenos. Sin embargo, a medida que se iba incrementando la longitud de cadena, el rendimiento iba disminuyendo al no consumirse completamente el material de partida.

4.3.1.2 Análisis de actividad biológica de bencilamidas con distinta longitud de cadena

Ninguna de las moléculas exhibió citotoxicidad significativa, observándose en todos los casos $\text{CC}_{50} > 100\mu\text{M}$ frente a células THP-1, asegurando un perfil toxicológico adecuado. Una vez confirmada la ausencia de citotoxicidad, se determinó su actividad inhibitoria sobre $\text{TNF-}\alpha$ (gráfica 1). Como control negativo, se utilizó el ácido oleico **10**.

²² B. Neises, W. Steglich. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522-524.

Gráfica 1. Influencia de la longitud de la cadena alquílica sobre TNF- α .



Los datos obtenidos revelaban que, según se producía la elongación de cadena, se acentuaba la acción sobre la diana. En el compuesto **6**, el cual presenta una cadena saturada de cuatro átomos de carbono, no existe inhibición relevante en la producción de TNF- α , exhibiendo el mismo valor que el ácido carboxílico libre (**10**). Según se va incrementando el número de átomos de carbono en la cadena, se incrementa la inhibición de TNF- α , llegando a un $IC_{50} = 16.6$ con el derivado del ácido esteárico **9**.

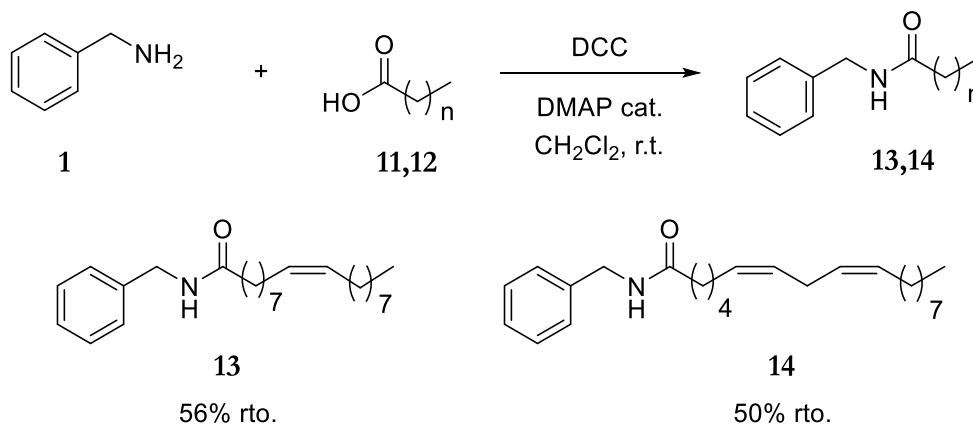
Se ensayó el ácido oleico libre **10**, para determinar si era el responsable de la actividad inhibitoria. Sin embargo, el ácido carboxílico libre no produce actividad significativa sobre la diana.

Este resultado puede justificarse mediante la lipofilia, un parámetro fisicoquímico que determina la capacidad de una sustancia para atravesar la membrana biológica.²³ Por lo que las amidas que presenten una mayor longitud de cadena podrán atravesar más fácilmente, mediante difusión, la barrera celular.

²³ a) Arnott, J. A.; Planey, S. L. *Expert Opin. Drug. Discov.* **2012**, *10*, 863-875. b) Waring, M. J.; Arrowsmith, A.; Leach, A. R.; Leeson, P.; Mandrell, S.; Owen, R. M.; Pairaudeau, G.; Pennie, W. D.; Pickett, S. D.; Wang, J.; Wallace, O.; Weir, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 475-486.

4.3.1.3 Síntesis de bencilamidas con distinto grado de insaturación en la cadena alquílica

Una vez confirmado que la cadena alifática de C₁₈ era la más adecuada, se procedió a estudiar cómo influye la presencia de insaturaciones. Se utilizaron el ácido oleico y el α -linoleico como precursores en la reacción de Steglich (esquema 2).



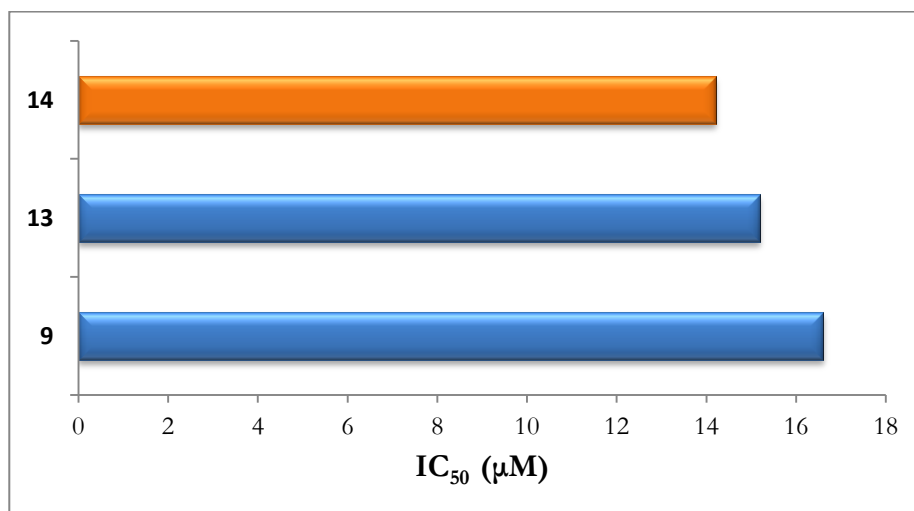
Esquema 2. Preparación de bencilamidas (**13**, **14**) mediante reacción de Steglich.

En este caso, los rendimientos obtenidos fueron moderados, con datos similares a los derivados del ácido esteárico, observándose que no finalizaba la reacción.

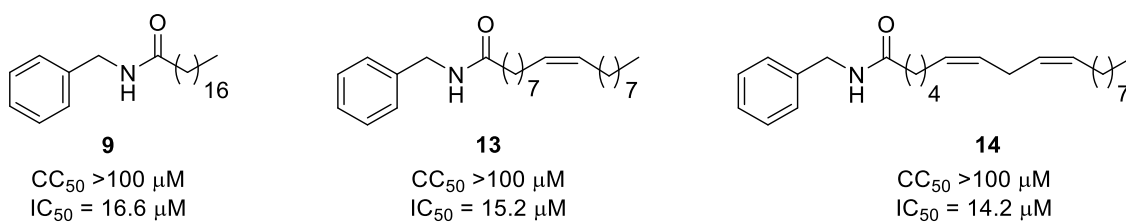
4.3.1.4 Análisis de actividad biológica de bencilamidas con distinto grado de insaturación en la cadena alquílica.

Se han utilizado el ácido oleico y α -linoleico, puesto que habían sido encontrados en las macamidas naturales.²⁴ La gráfica 4 muestra cómo influye la introducción de insaturaciones en la actividad biológica.

Gráfica 2. Influencia del grado de insaturación en la cadena alquílica sobre TNF- α .



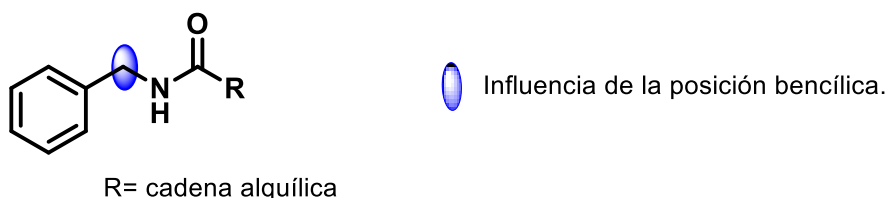
²⁴ Alasmari, M.; Böhlke, M.; Kelley, C.; Maher, T.; Pino-Figueroa, A. *Mol. Neurobiol.* **2019**, 56, 1770-1781.



Los resultados revelan que la presencia de dobles enlaces mejora la inhibición sobre la producción de TNF- α , si bien este cambio no es tan relevante como ocurriría con la elongación de cadena. El derivado de α -linoleico **14** presentó la mejor actividad con un valor de 14.2 μM, por lo que decidió utilizarse para las posteriores modificaciones.

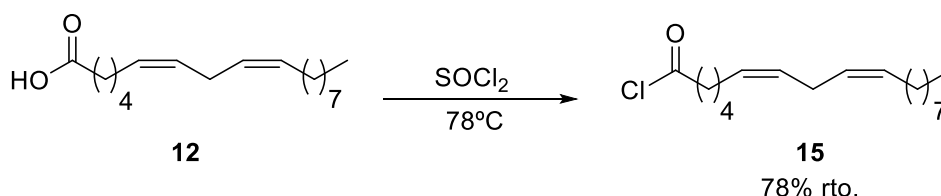
4.3.2 INFLUENCIA DE LA POSICIÓN BENCÍLICA

El siguiente punto en la investigación de la relación estructura-actividad, fue estudiar la influencia de sustituyentes en la posición bencílica.



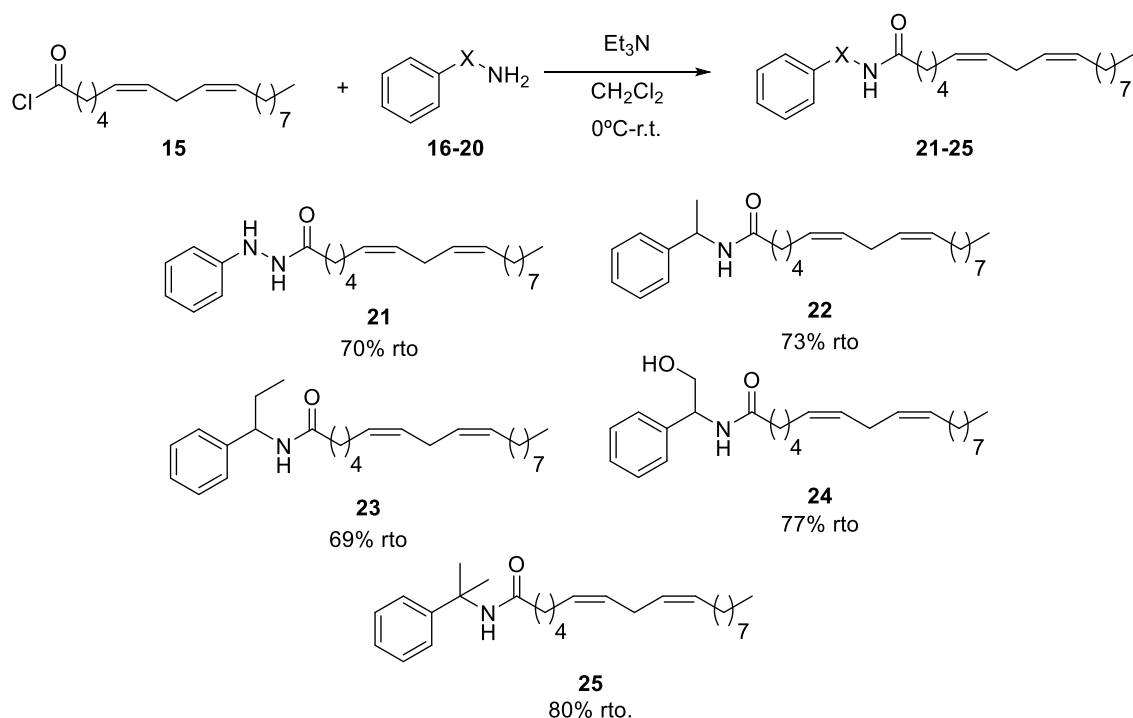
4.3.2.1 Síntesis de análogos sustituidos en la posición bencílica

Debido a la caída de rendimiento cuando se incrementa la longitud de cadena alquílica utilizando la reacción de Steglich, se alteró la metodología sintética, utilizando como precursor cloruro de linoleilo en lugar del ácido oleico, siguiendo el esquema 3.



Esquema 3. Preparación de cloruro de linoleilo (**15**).

El cloruro de linoleilo (**15**) se hace reaccionar con diferentes aminas, dando lugar a distintos análogos (esquema 4).



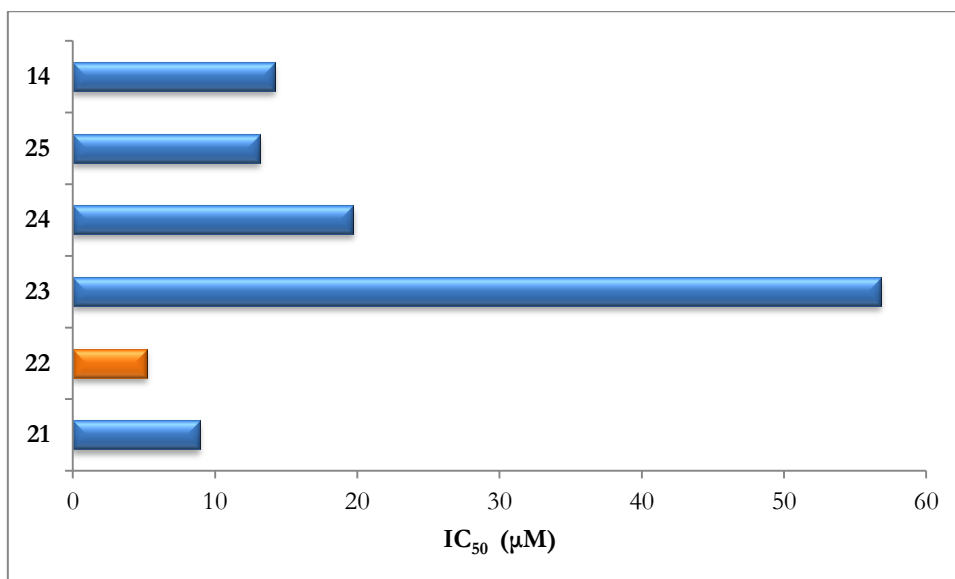
Esquema 4. Síntesis de derivados sustituidos en la posición bencílica (**21-25**).

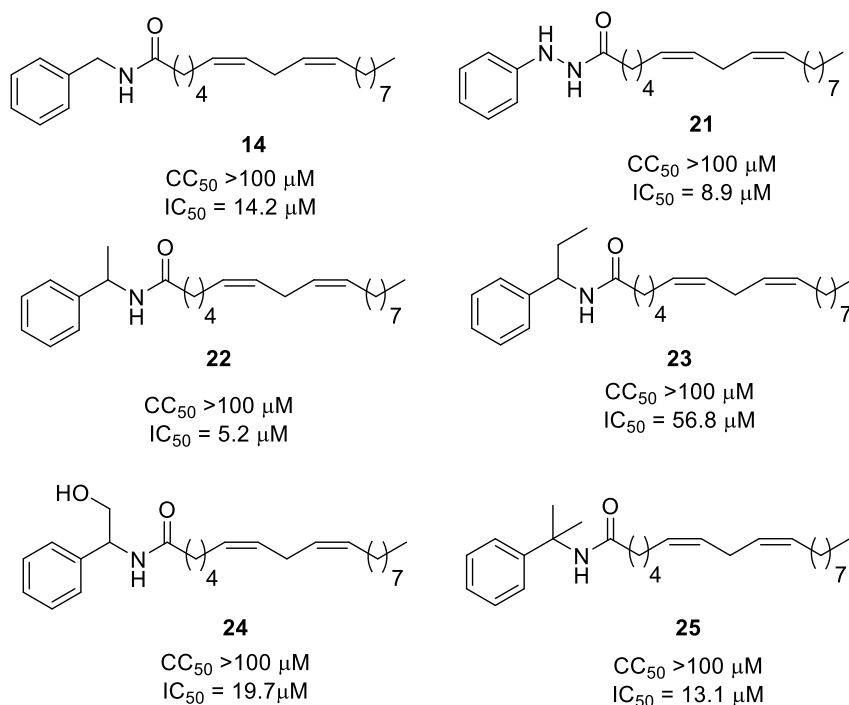
En todos los ejemplos utilizados se obtuvieron rendimientos de moderados a altos, mejorándose los resultados con respecto a la metodología de Steglich.

4.3.2.2 Análisis de actividad biológica de bencilamidas sustituidas en la posición bencílica.

Para entender cómo repercute esta posición en la actividad se han probado: la hidrazida (**21**), un resto metilo sustituido en la posición bencílica (**22**), un resto etilo (**23**), un resto hidroxietilo (**24**) y la sustitución de la posición bencílica con dos metilos (**25**). Los datos de actividad se muestran en la gráfica 3.

Gráfica 3. Influencia de la sustitución en la posición bencílica sobre TNF- α .





Los datos revelaron que la sustitución en la posición bencílica repercutía en la actividad biológica. El compuesto **21**, que presenta un enlace hidrazida en lugar de amida, mejoró la actividad biológica, exhibiendo un IC_{50} de $8.9 \mu M$. La sustitución en la posición bencílica por un grupo metilo (**22**), mejoró significativamente la actividad, $IC_{50} = 5.2 \mu M$. Este resultado lleva a pensar que la distribución geométrica tiene una importante influencia sobre la actividad. Esta hipótesis quedó demostrada con los derivados **23**, **24** y **25**, cuyos sustituyentes en la posición bencílica tenían mayor volumen que los de la molécula **22** y todos mostraron valores inferiores de IC_{50} . Dado que el compuesto **22** se ha sintetizado como racémico en la posición bencílica, con el fin de analizar cómo influye la quiralidad, se decidió sintetizar sus enantiómeros.

4.3.2.3 Síntesis de los derivados quirales

En la figura 8 se observan los dos productos quirales de **22**; el procedimiento sintético llevado a cabo fue el mismo que el detallado en el esquema 4. Los rendimientos fueron similares a los de **22**, siendo del 72% para la (*S*)-N-(1-pheniletil)linololeicamida (**26**) y del 75% para la (*R*)-N-(1-pheniletil)linololeicamida (**27**).

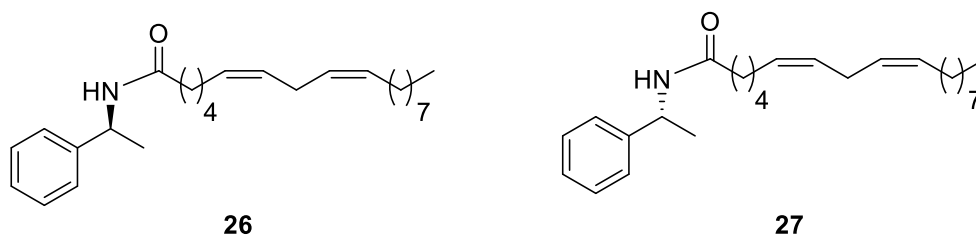
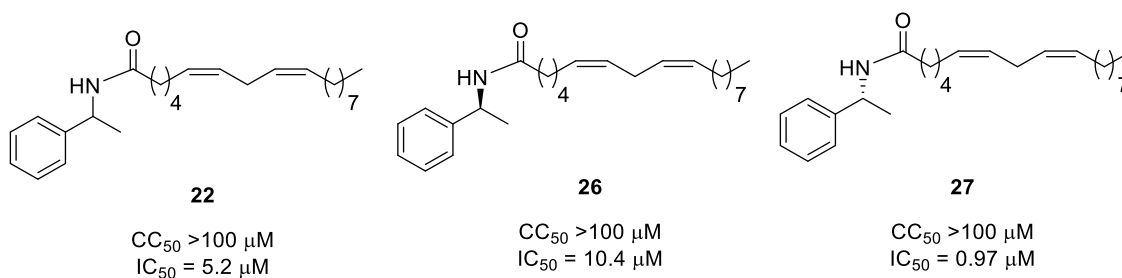
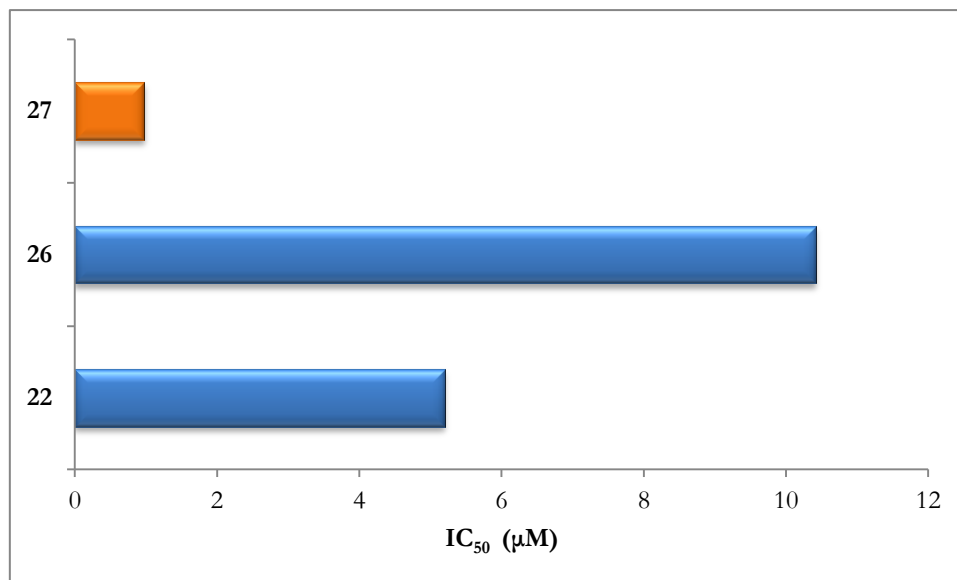


Figura 8. Estructura química de los productos quirales **26** y **27**.

4.3.2.4 Análisis de actividad biológica de los derivados quirales

Los valores de actividad comparados entre los productos quirales y el racémico, se muestran en la gráfica 4.

Gráfica 4. Influencia de la quiralidad sobre TNF- α .



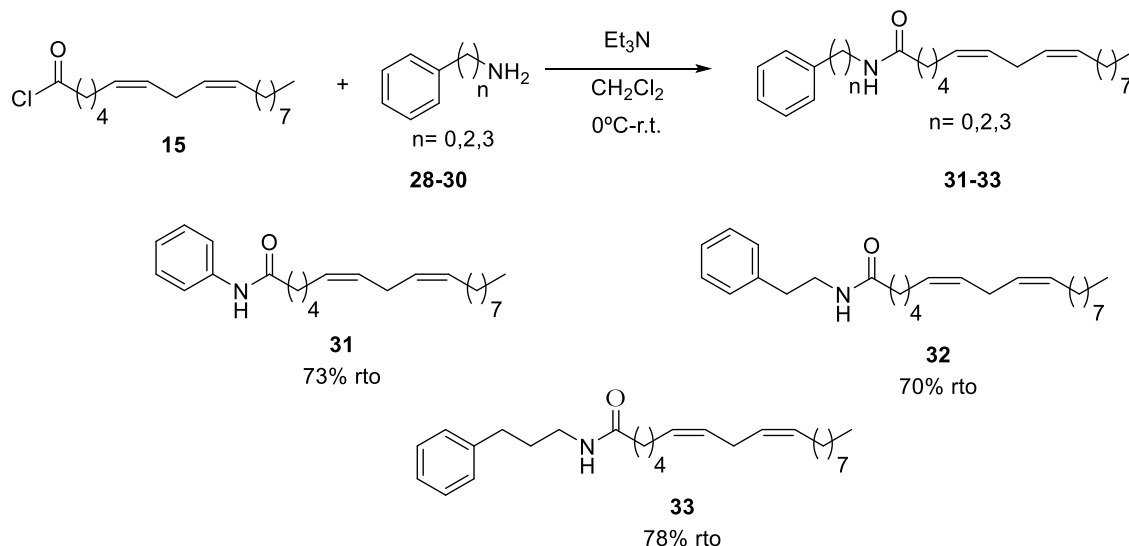
El análisis de los datos muestra que la quiralidad juega un papel crítico. Mientras que el enantiómero *S* (**26**) disminuye la actividad biológica respecto al racemato, con un IC₅₀=10.4 μM, el enantiómero *R* (**27**) mostró una mejora sustancial con respecto al racemato, con un IC₅₀ de 0.97μM.

Este hallazgo determina que el compuesto diseñado tiene una afinidad muy específica sobre la diana. La isomería óptica es uno de los apartados que cobra mayor relevancia en la farmacomodulación, debido a la especificidad que suelen presentar las dianas biológicas.²⁵

²⁵ a) Eriksson, T.; Björkman, S.; Roth, B.; Fyge, A.; Höuglund, P. *Chirality*. **1995**, 7, 44-52. b) Calcaterra, A.; D'Acquarica, I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, 147, 323-340.

4.3.2.5 Síntesis de homólogos estructurales

Tras los excelentes resultados logrados en la investigación sobre la sustitución en la posición bencílica, se decidió continuar el estudio de farmacomodulación con la síntesis de homólogos (adicción o sustracción de grupos metilenos) sobre la posición bencílica. Partiendo de cloruro de linoleilo (**15**) y utilizando diferentes aminas, desde anilina ($n=0$) hasta la 3-fenil-1-propilamina ($n=3$), se obtienen los correspondientes amidas (**31-33**) (esquema 5).



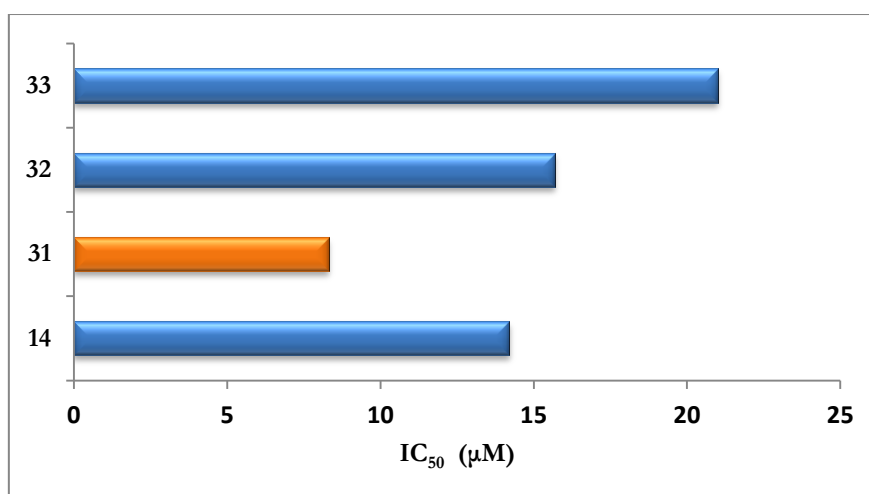
Esquema 5. Preparación de homólogos estructurales (**31-33**).

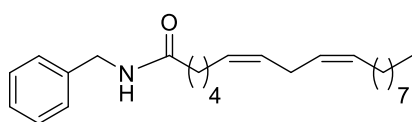
Los rendimientos conseguidos fueron similares a los de derivados anteriores.

4.3.2.6 Actividad biológica de homólogos estructurales

Los resultados de actividad exhibida por los homólogos estructurales, quedan reflejados en la gráfica 5.

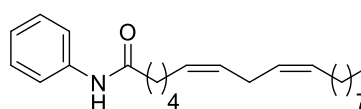
Gráfica 5. Influencia de la homología estructural sobre $\text{TNF-}\alpha$.





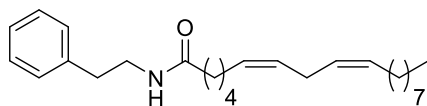
14

$CC_{50} > 100 \mu M$
 $IC_{50} = 14.2 \mu M$



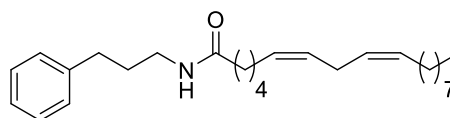
31

$CC_{50} > 100 \mu M$
 $IC_{50} = 8.3 \mu M$



32

$CC_{50} > 100 \mu M$
 $IC_{50} = 15.7 \mu M$



33

$CC_{50} > 100 \mu M$
 $IC_{50} = 21 \mu M$

El estudio de homólogos estructurales sirvió para confirmar la hipótesis sobre la relevancia en la disposición geométrica.

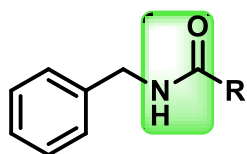
Conforme se va incrementando el número de metilenos, disminuye la actividad biológica; en el caso del compuesto **32** la variación con respecto a la molécula **14** es de $1.7 \mu M$. Con la introducción de un segundo grupo metileno, compuesto **33**, el efecto es más acentuado. Sin embargo, cuando se utilizó anilina como precursor para formar la correspondiente amida (**31**), se mejoró la actividad biológica, presentando un IC_{50} de $8.3 \mu M$.

Estos datos pueden justificarse en base a dos efectos. El primer efecto puede ser a causa de la disposición geométrica de la bencilamina, y la anilina es más adecuada sobre la diana, perdiéndose interacción según se aumenta la longitud de la cadena. El segundo se basa en la distribución electrónica, en la cual el nitrógeno al ser un activante fuerte modifica la distribución electrónica del anillo aromático y, por consiguiente, su interacción. Si bien, este segundo efecto no se considera que tenga mucha trascendencia, debido a la gran disminución de actividad observada entre las moléculas **14** y **33**.

Pese a que el compuesto **31** ha mostrado valores satisfactorios, no logró alcanzar los valores de otros derivados como ocurre con las moléculas **22** y **27**.

4.3.3 INFLUENCIA DEL ENLACE AMIDA

Una vez finalizado el estudio de estructura-actividad sobre la posición bencílica, se procedió a analizar cómo influye el enlace amida en la actividad biológica.



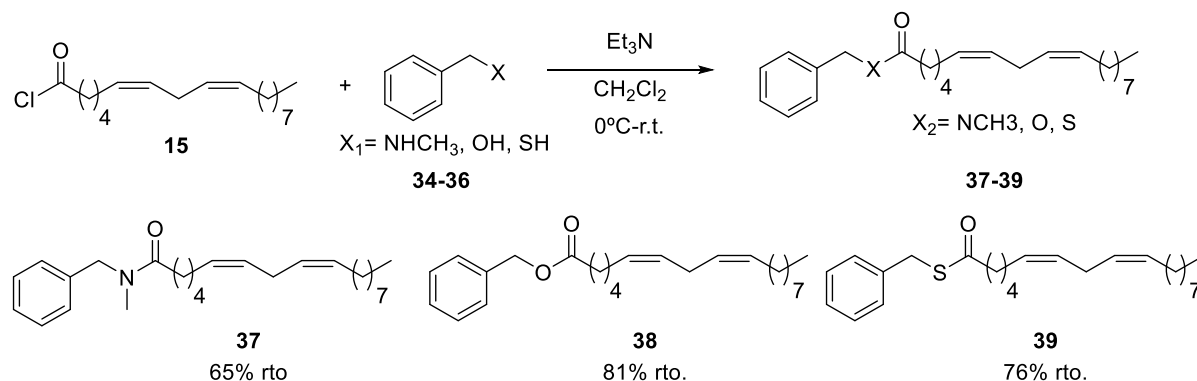
R = cadena alquílica



Influencia del enlace amida.

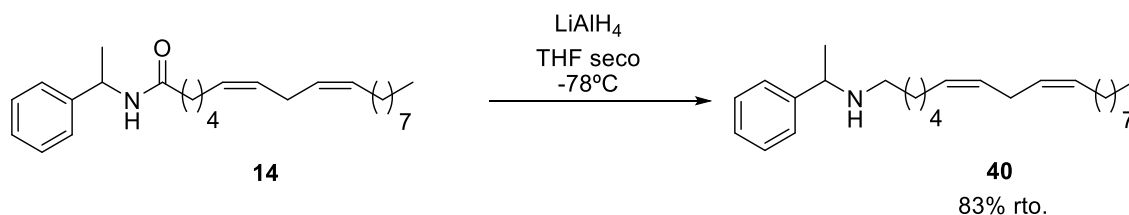
4.3.3.1 Síntesis de análogos modificados en el enlace amida

En este punto, se introdujeron cambios en el enlace amida; para ello se sintetizaron: el derivado metilado en el nitrógeno (**37**), el bencil éster (**38**) y el bencil tioéster (**39**) (esquema 6).

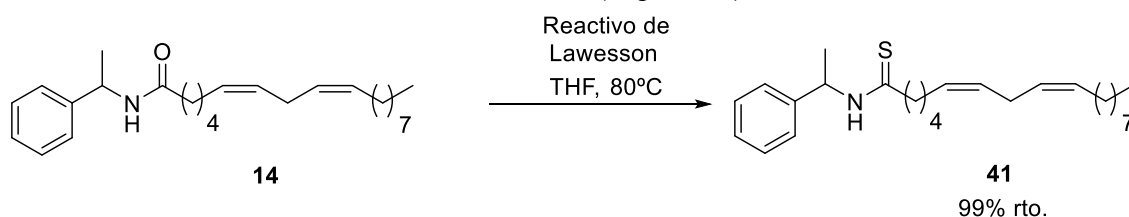


Todos los productos fueron obtenidos con rendimientos que van de moderados a buenos.

La amina **40** se consiguió mediante reducción de la amida **14** con LiAlH_4 con un rendimiento del 90% (esquema 7).



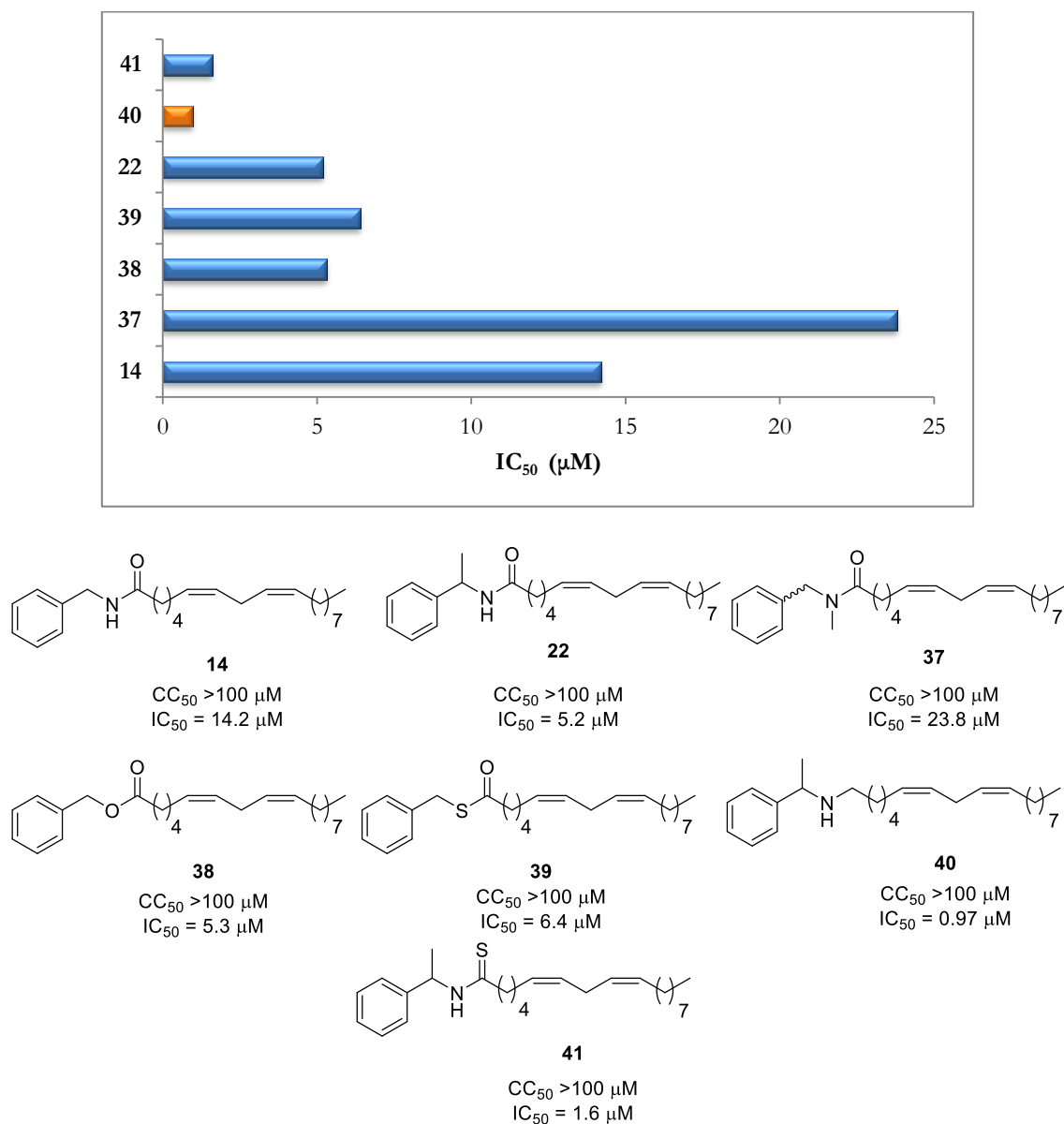
La tioamida **41** fue sintetizada de manera cuantitativa a partir de la amida **14** mediante reacción con el reactivo de Lawesson (esquema 8).



4.3.3.2 Actividad biológica de análogos modificados en el enlace amida

Los resultados de actividad biológica se muestran en la gráfica 6.

Gráfica 6. Influencia del enlace amida sobre TNF- α .



Los datos revelaron que el derivado con el nitrógeno del enlace amida metilado (**37**) pierde actividad significativamente, IC₅₀ = 23.8 μM. Esta disminución se considera que podría ser debida a la necesidad del hidrógeno en el enlace amida para formar un enlace de hidrógeno con la diana.

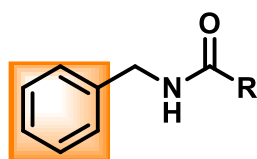
La sustitución del N-H en el enlace amida por otros heteroátomos como oxígeno y azufre, compuestos **38** y **39**, repercutió favorablemente sobre la inhibición de TNF- α , exhibiendo valores de inhibición similares a los de **22**.

Para observar la influencia del enlace amida, también se modificó el grupo carbonilo estudiándose como influía la conversión del enlace amida en tioamida **41** y la supresión del mismo, dando lugar a la amina **40**. En ambos casos ocurría un aumento en la inhibición de TNF- α , donde destaca el valor de la amina **40**, que mostró el mismo valor que el mejor candidato logrado hasta el momento (**27**).

Estos resultados denotan que la alteración en el enlace amida es clave para la actividad biológica, observándose en algunos derivados una mejoría muy significativa en la actividad inhibitoria.

4.3.4 INFLUENCIA DEL ANILLO AROMÁTICO

Para finalizar la primera etapa de relación estructura actividad, se investigó la influencia del anillo aromático en la inhibición de TNF- α .

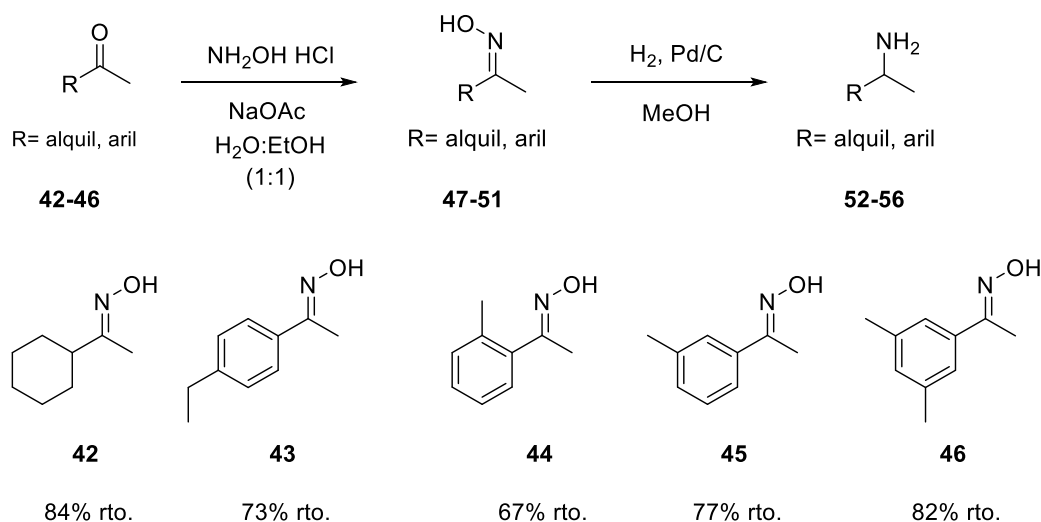


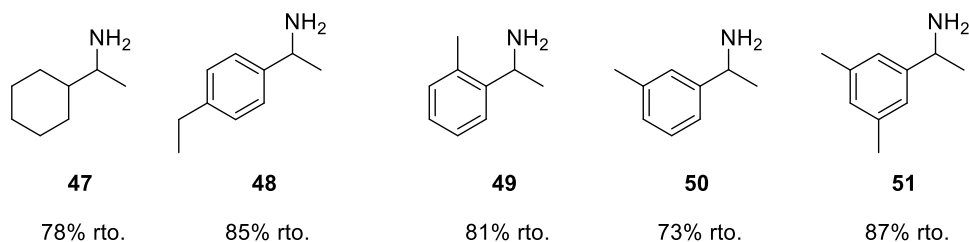
 Influencia del anillo aromático.

R= cadena alquílica

4.3.4.1 Síntesis de análogos modificados en el anillo aromático

En este apartado se introdujeron cambios en la posición del anillo aromático; para ello, se investigó si la presencia de este era influyente y cómo afectaba la introducción de sustituyentes. En este sentido, se han preparado dos tipos de derivados: aquellos en los que el anillo aromático ha sido sustituido por grupos alquilo (**60**, **65** y **66**), y sobre los que el anillo aromático presentaba distintos tipos de sustituyentes (**61-64**, **67-72**). En todos los casos, la metodología sintética ha sido la utilizada anteriormente. Sin embargo, debido a la falta de disponibilidad comercial de algunas aminas objeto de estudio, estas tuvieron que ser sintetizadas siguiendo la ruta del esquema 9.

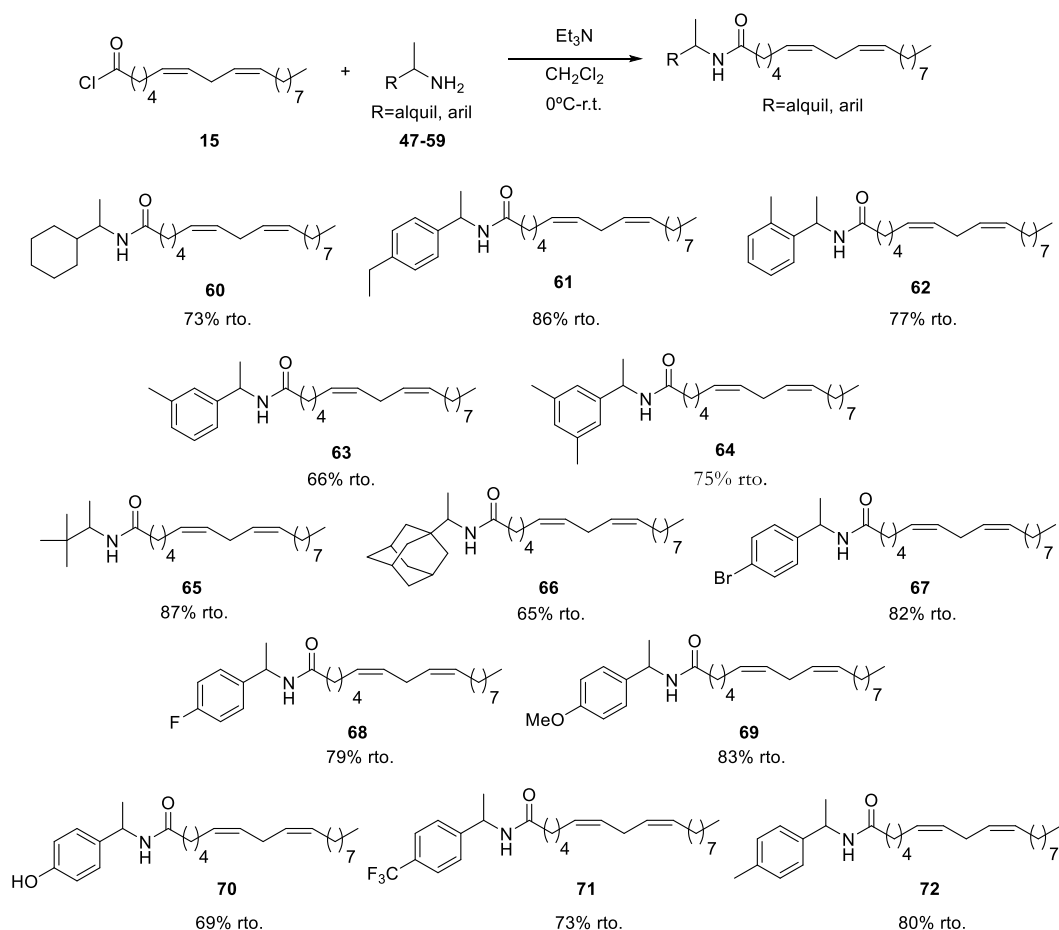




Esquema 9. Obtención de cetoximas (42-46) y aminas (47-51).

La síntesis de las aminas no disponibles comercialmente, se llevó a cabo en dos etapas. En una primera, se sintetizaron las cetoximas a partir de las correspondientes cetonas e hidroxilamina. En todos los productos, los rendimientos fueron adecuados, con valores entre el 67% y el 84%. En la segunda, se procedió a la reducción hasta la correspondiente amina, mediante una hidrogenación catalítica, lográndose buenos rendimientos.

Una vez realizadas las aminas, se sintetizaron sus correspondientes amidas (esquema 10).



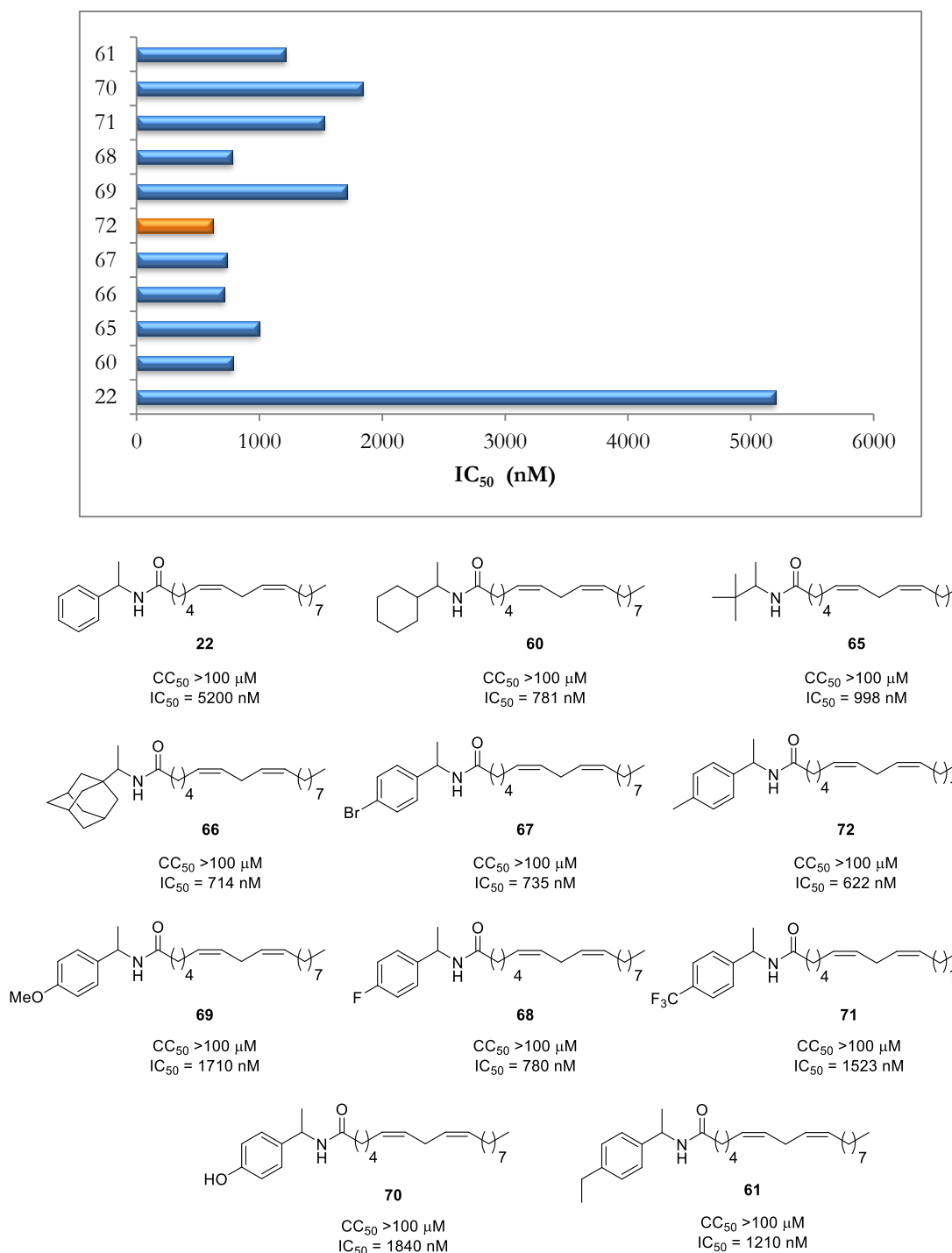
Esquema 10. Síntesis de análogos modificados en el anillo aromático (60-72).

Todos los productos fueron obtenidos con rendimientos que van de moderados a buenos, no mostrándose dependencia con el tipo de sustituyente.

4.3.4.2 Actividad biológica de análogos modificados en el anillo aromático

Las modificaciones realizadas sobre el anillo aromático produjeron una variación significativa en la actividad biológica (gráfica 7).

Gráfica 7. Influencia del anillo aromático sobre TNF- α .



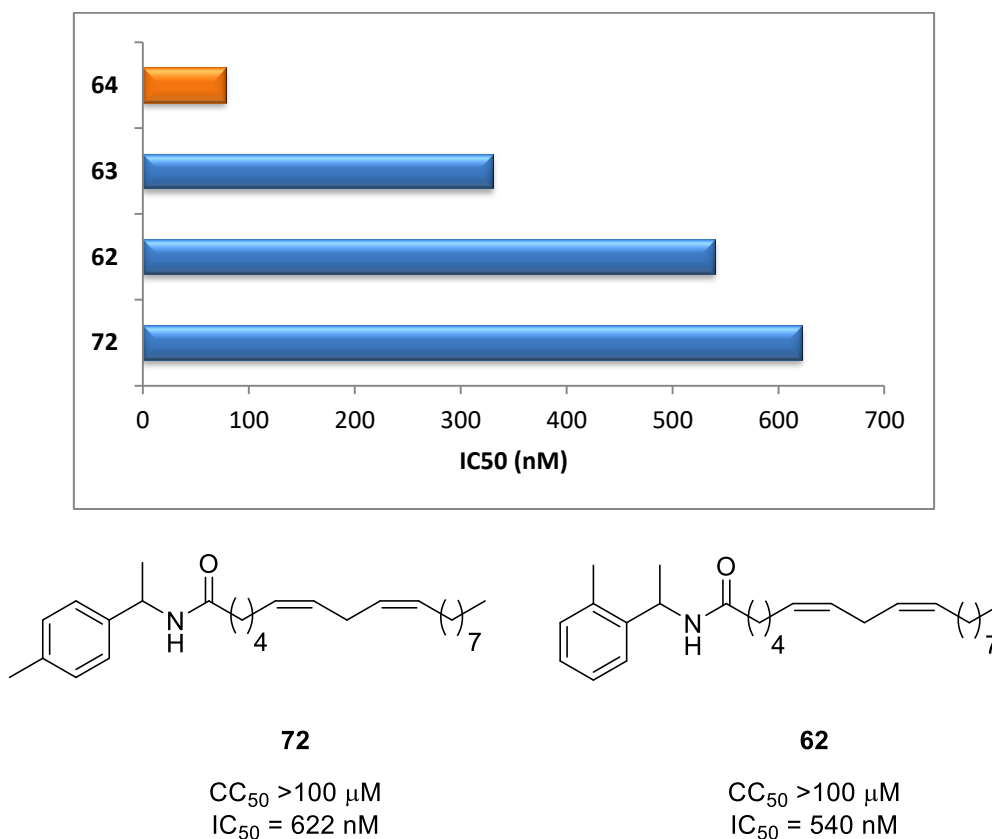
Como se puede observar en la gráfica 7, los cambios realizados sobre el anillo aromático repercuten muy favorablemente sobre la actividad. Cuando se sustituye el anillo bencénico por un grupo ciclohexilo (**60**), un grupo tert-butilo (**65**) o un grupo adamantilo

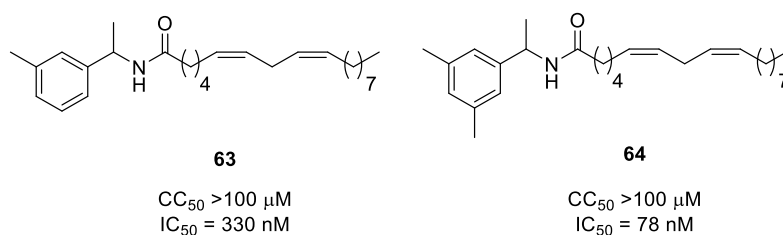
(66) ocurre una mejora de la actividad biológica, especialmente sobre el compuesto 66. Estos datos demuestran que la aromaticidad no es un efecto clave para la actividad y que, de nuevo, es la disposición geométrica la que determina la actividad biológica.

También se decidió introducir sustituyentes en el anillo aromático; para ello se utilizaron grupos activantes y desactivantes. Si bien, todas las sustituciones mejoraban la actividad respecto al anillo aromático libre, la tendencia muestra que las sustituciones con grupos activantes y desactivantes fuertes, genera los peores resultados. Los desactivantes débiles, como 67 y 68, mostraron valores muy similares a los obtenidos para los sustituyentes alquílicos, con valores de IC_{50} de 735 y 780 nM, respectivamente. El sustituyente que mejor actividad biológica exhibió fue 72, el cuál presenta un grupo activante débil al tener un resto metilo en la posición *para* del anillo aromático, con un IC_{50} de 622 nM. En base a este resultado, se comprobó cómo ocurría en la actividad la introducción de un grupo etilo en la posición *para* (61), y se observó que la introducción de un átomo de carbono más genera una disminución de la actividad biológica, $IC_{50} = 1210$ nM.

En vista de los datos, se decidió analizar cómo influye la posición del metilo sobre el anillo aromático sobre actividad biológica (gráfica 8).

Gráfica 8. Influencia de la posición del metilo sobre el anillo aromático en $TNF-\alpha$.





La variación de la posición dentro del anillo provoca una mejoría considerable en la actividad biológica; este efecto es especialmente marcado cuando la sustitución es realizada en la posición *meta* (**63**), donde la correspondiente amida tenía un IC₅₀ de 330 nM. En base a este valor, se decidió estudiar la di-sustitución en la posición *meta*, obteniéndose el mejor derivado sustituido en el anillo aromático (**64**), presentando un IC₅₀ correspondiente a 78 nM. Estos datos demuestran la fuerte dependencia existente entre la geometría de la molécula y la actividad biológica, resultando la modificación sobre el anillo aromático, la posición del farmacóforo más influyente.

4.3.5. OPTIMIZACIÓN DEL CABEZA DE SERIE

Una vez llegados a este punto, se habían analizado todas las posiciones modulables, determinándose los mejores sustituyentes para cada posición como refleja la figura 9.

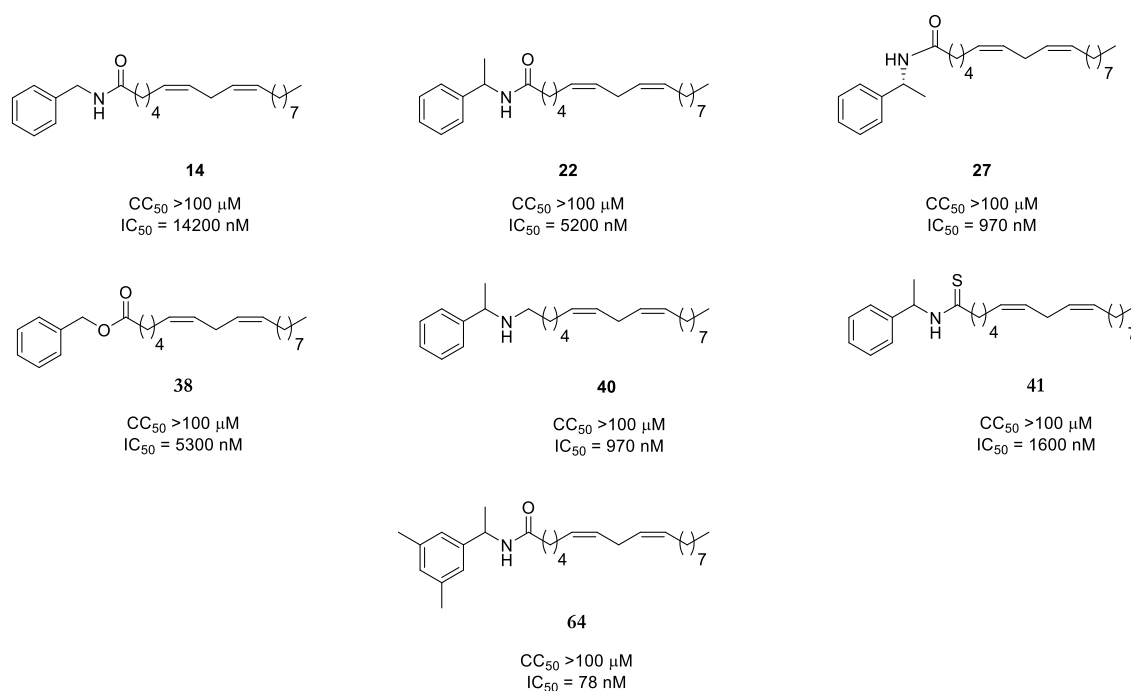


Figura 9. Estructura química de los mejores candidatos.

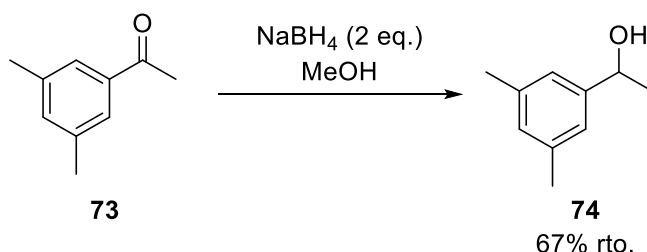
En la influencia de la cadena alquílica, el ácido linoleico fue el mejor sustituyente (**14**). En el análisis de la posición bencílica, la introducción de un resto metilo en dicha posición (**22**) es clave, observándose una gran especificad con respecto a otros sustituyentes en los que se produce disminución de la actividad biológica. La obtención del R-isómero (**27**), el cuál resultaba 5 veces más potente que su correspondiente producto racémico (**22**), demuestra la alta afinidad de la molécula debido a su geometría sobre la diana. En el

estudio del enlace amida, tanto el éster (**38**) como la amina (**40**) y la tioamida (**41**), generan un efecto favorable sobre la actividad biológica. Finalmente, la introducción de dos grupos metilos en la posición *para* produce un aumento significativo en la actividad biológica con un IC₅₀ de 78 nM. Se determinó que el efecto generado por estos sustituyentes era de tipo estérico y no electrónico.

En base a estos datos, se decidió sintetizar los análogos con los sustituyentes óptimos en cada posición. Es decir, análogos que presenten el anillo aromático sustituido con dos metilos en posición *meta* y un grupo metilo en la posición bencílica, para analizar su actividad biológica.

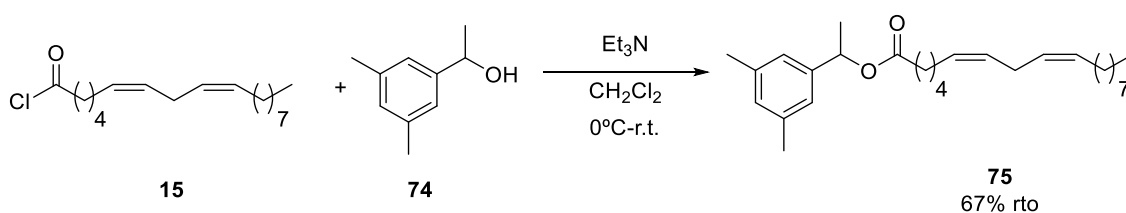
4.3.5.1 Síntesis de análogos optimizados

Para llevar a cabo la preparación del éster, se comenzó con la reducción de la cetona **73** hasta el alcohol **74** (esquema 11).



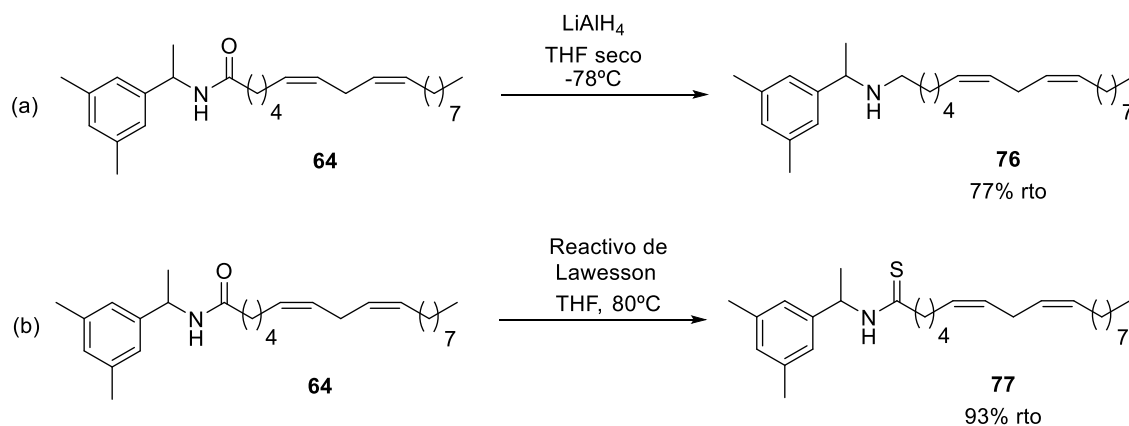
Esquema 11. Reducción de la cetona al alcohol **74**.

El correspondiente alcohol se sintetizó mediante la reducción de la cetona con NaBH₄, el rendimiento fue moderado, 67%. La metodología sintética utilizada para llevar a cabo el éster **75** ha sido la misma que la utilizada para sintetizar el derivado **38**, haciendo reaccionar el cloruro de ácido (**15**) con el alcohol **74** (esquema 12). El rendimiento fue similar al de productos anteriores.



Esquema 12. Reacción para la obtención del éster **75**.

Para la síntesis de la amina **76** (esquema 13a), se llevó a cabo la reducción de la amida **64** con LiAlH₄, como se había realizado anteriormente para obtener **40**. En el caso de la tioamida **77** se hizo reaccionar **64** con el reactivo de Lawesson (esquema 13b). En ambos casos, se alcanzaron rendimientos similares a los de productos **40** y **41**, respectivamente.

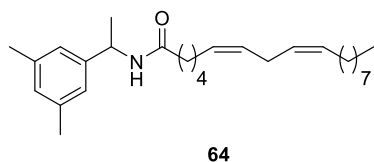
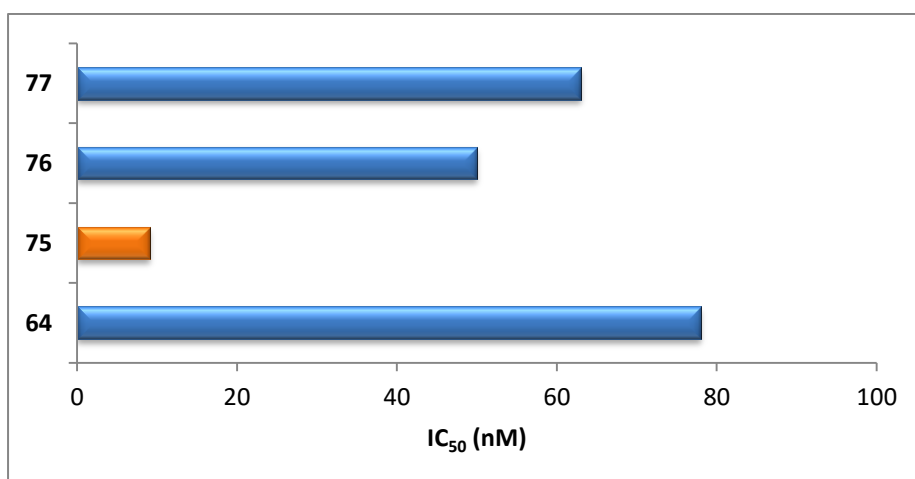


Esquema 13. (a) Reacción para la obtención de la amina **76**. (b) Reacción para la síntesis de la tioamida **77**.

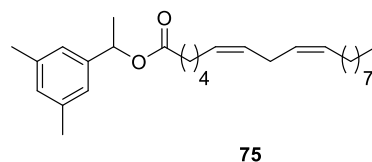
4.3.5.2 Actividad biológica de los análogos optimizados

La introducción de las optimizaciones dentro de las moléculas generó un efecto sinérgico en el cual mejoró la actividad en todos los casos como muestra la gráfica 9.

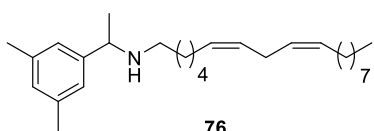
Gráfica 9. Influencia de los productos optimizados en TNF- α .



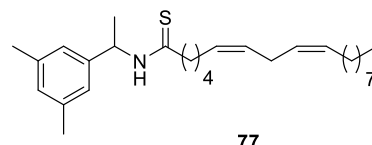
CC₅₀ >100 μ M
IC₅₀ = 78 nM



CC₅₀ >100 μ M
IC₅₀ = 9 nM



CC₅₀ >100 μ M
IC₅₀ = 50 nM



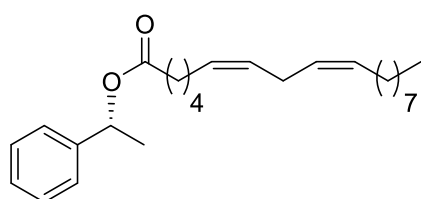
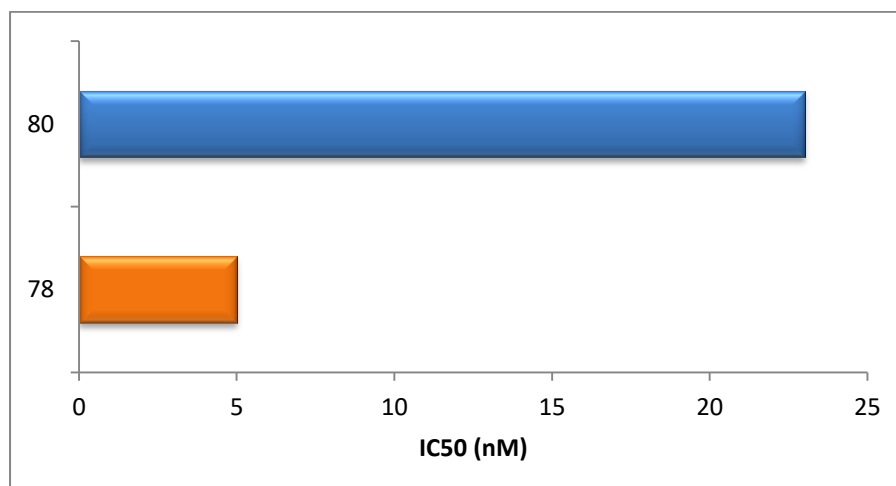
CC₅₀ >100 μ M
IC₅₀ = 63 nM

La introducción del grupo tiocarbonilo (**77**) logró una ligera mejoría sobre la actividad con un IC_{50} de 63 nM. En el caso de la amina (**76**), como era de esperar, en vista de los resultados anteriores, el efecto fue más acentuado con un IC_{50} de 50 nM. Finalmente, el éster (**75**) ha mostrado el mayor efecto inhibitorio con un IC_{50} de 9 nM. Este efecto podría justificarse en base a la diferencia existente entre el enlace amida y el enlace éster, ya que este último presenta menor rigidez que el enlace amida y podría adecuarse al centro activo de la diana.

4.3.5.3 Análisis del cabeza de serie frente a fármacos comerciales

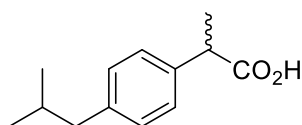
Tras observar los datos de los análogos optimizados, se decidió sintetizar el derivado **78** (gráfica 10), siguiendo la metodología sintética descrita para sintetizar el compuesto **75**. El compuesto **78** fue comparado frente al AINE ibuprofeno (**79**) y el analgésico paracetamol (**80**), dos de los medicamentos más ampliamente extendidos para el tratamiento del dolor.

Gráfica 10. Estudio comparativo del compuesto **78** frente a ibuprofeno (**79**) y paracetamol (**80**).



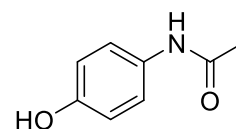
78

$CC_{50} > 100 \mu M$
 $IC_{50} = 5 \text{ nM}$



79

$CC_{50} > 100 \mu M$
 $IC_{50} = 13 \text{ mM}$



80

$CC_{50} > 100 \mu M$
 $IC_{50} = 23 \text{ nM}$

Los datos revelan que el cabeza de serie **78**, es más potente que los dos fármacos comerciales. El ibuprofeno, apenas exhibe actividad inhibitoria sobre $TNF-\alpha$, mostrando un IC_{50} de 13 μM . En el caso del analgésico paracetamol se han observado valores de inhibición similares a algunos derivados sintetizados durante el capítulo, con un valor de $IC_{50} = 23 \text{ nM}$.

Con estos resultados, se logra uno de los principales objetivos del capítulo, al confirmarse que las macamidas actúan sobre TNF- α , mientras que los AINE no. El producto **78** presenta las características químicas adecuadas de potencia y toxicidad *in vitro*, para investigarse en mayor profundidad tanto su mecanismo de acción, como su posible aplicación sobre modelos animales. Por tanto, las macamidas pueden abrir la vía al desarrollo de antiinflamatorios con nuevos mecanismos de acción, y un mejor perfil de seguridad respecto a los fármacos disponibles en el mercado.

4.4 CONCLUSIONES

Después de realizar el estudio de relación estructura-actividad a partir de macamidas naturales, las conclusiones que se extraen del mismo son:

- El alargamiento de la cadena alifática y la introducción de dobles enlaces en las macamidas, mejora la actividad inhibitoria sobre TNF- α ; esto queda reflejado en los productos **9** y **14**.
- La introducción de un grupo metilo en la posición bencílica (**21**), mejora significativamente la actividad biológica.
- La quiralidad del metilo en la posición bencílica resulta clave sobre la actividad inhibitoria, como se observa en el enantiomero R (**27**), que denota una gran afinidad conformacional sobre la diana.
- El elongamiento de la posición bencílica mediante la introducción de grupos metileno, genera una disminución de la actividad inhibitoria, como ocurre en los compuestos **32** y **33**.
- La sustitución del enlace amida por un enlace éster (**38**), tioéster (**39**), amina (**40**) y tioamida (**41**), produce un efecto positivo sobre la inhibición de TNF- α .
- Se ha determinado que no es necesario la presencia de un anillo aromático en las macamidas para que estas presenten actividad biológica, compuestos **60**, **65** y **66**.
- La introducción de sustituyentes en el anillo aromático genera una mejoría de la actividad biológica, siendo la disustitución en *meta* con grupos metilo la más activa, como refleja la molécula **64**.
- Tras el proceso de optimización, el mejor candidato es la molécula **78**. Se ha confirmado que las macamidas actúan selectivamente sobre TNF- α y su mecanismo de acción difiere al de los AINE.

4.5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.5.1 TÉCNICAS GENERALES QUÍMICAS

Cromatografía en capa fina

El estudio mediante cromatografía en capa fina, se ha efectuado con cromatofolios de aluminio con gel de sílice (Merck-60 230-400 mesh) de 0.2 mm de espesor. Para la visualización de los cromatogramas se utilizó luz ultravioleta (254 nm) y ácido fosfomolibdico.

Cromatografía en columna

Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice (Merck, 230-400 mesh ASTM). El eluyente se indica en cada caso, así como las proporciones relativas de disolvente volumen/volumen.

Espectrometría de resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance DRX 500 operando a 500 MHz (H^1) o 125 MHz (C^{13}) y un Bruker Avance AV-I operando a 300 MHz (H^1) o 75 MHz (C^{13}). Los desplazamientos químicos (δ) están indicados en ppm relativas a las señales residuales de disolvente deuterado: δ_H 7.26 y δ_C 77.2 para $CDCl_3$, δ_H 3.31 y δ_C 49.0 para $MeOD-d_4$, δ_H 2.50 y δ_C 39.5 para $DMSO-d_6$. Los espectros de RMN- C^{13} fueron adquiridos en un sistema de banda ancha desacoplado de protón. Las siguientes abreviaturas fueron utilizadas para describir los patrones de los picos: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuartete), quint (quintete), sext (sextuplete), sept (septuplete), m (multiplete) y br (señal ancha).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se registró en un espectrómetro QSTAR XL de cuadrupolo con TOF, utilizando técnicas de impacto electrónico (EI+), a 70 e. V., y electrospray (ESI+).

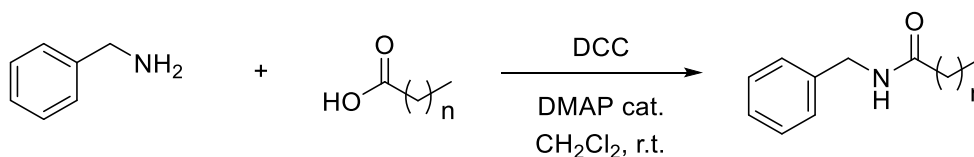
Rotaciones específicas

Los valores de rotación óptica ($[\alpha]_D$) se han medido a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin-Elmer 241C. En cada caso se indica el disolvente y la concentración (mg/mL) utilizados.

Disolventes y reactivos

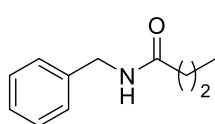
Los disolventes y reactivos utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales y utilizados sin previa purificación.

4.5.2 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA ACILACIÓN DE BENCILAMINA CON ÁCIDOS GRASOS



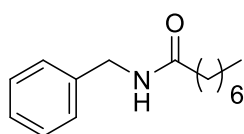
En un matraz de fondo redondo se añade el correspondiente ácido carboxílico (1 eq) y se disuelven en CH_2Cl_2 seco (1 mL/mmol de ácido carboxílico). Posteriormente, se adiciona la DCC (1.2 eq). Se mantiene la mezcla en agitación durante 15 minutos, tras los cuales, se añade una mezcla de DMAP (10% moles) y bencilamina (1 eq) disuelta en CH_2Cl_2 seco (1 mL/mmol bencilamina). Se mantiene la mezcla de reacción agitando durante 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se filtra el sólido blanco formado a través de una placa filtrante y se elimina el disolvente del filtrado mediante evaporación a presión reducida. El crudo de reacción se purifica a través de cromatografía flash utilizando como eluyente Hexano-AcOEt.

N-bencilbutiramida, (**6**)



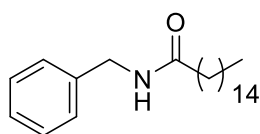
Partiendo del ácido butanóico (300 mg, 3.41 mmol) y bencilamina (3.41 mmol) se obtienen 508 mg de la amida **6** (rto. 90%) como sólido blanco. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (3:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.94 (t, 3H, J = 7.4 Hz), 1.66 (s, 2H, J = 7.4 Hz), 2.17 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 4.40 (d, 2H, J = 5.7 Hz), 6.19 (bs, 1H), 7.29-7.16 (m, 5H). **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 13.9, 19.3, 38.7, 43.5, 127.5, 127.8, 128.7, 138.5, 173.1.

N-bencilcaprilamida, (**7**)



Partiendo del ácido octanoico (443 mg, 3.07 mmol) y bencilamina (329 mg, 3.07 mmol) se obtienen 620 mg de la amida **7** (rto. 81%) como sólido blanco. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (3:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.85 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 1.26-1.17 (m, 8H), 1.63 (q, 2H, J = 7.4 Hz), 2.18 (t, 2H, J = 7.7 Hz), 4.41 (d, 2H, J = 5.7 Hz), 5.80 (bs, 1H), 7.28-7.19 (m, 5H). **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 14.2, 22.7, 25.9, 29.1, 29.4, 31.8, 36.9, 43.7, 127.5, 127.9, 128.8, 138.5, 173.1.

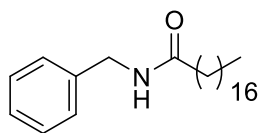
N-bencilpalmitamida, (**8**)



Partiendo del ácido palmítico (788 mg, 1.12 mmol) y bencilamina (119 mg, 1.12 mmol) se obtienen 580 mg de la amida **8** (rto. 60%) como sólido blanco. El producto se purifica con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.85 (t, 3H, J = 7.2 Hz), 1.26-1.17 (m, 24H), 1.61 (q, 2H, J = 7.7 Hz), 2.18 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 4.41 (d, 2H, J = 5.7 Hz), 5.72 (bs, 1H), 7.32-7.20 (m, 5H). **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 14.3, 22.8,

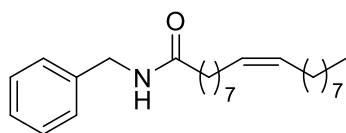
25.9, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.9 29.9, 32.0, 36.9, 43.7, 127.6, 127.9, 128.8, 138.5, 173.1.

N-bencilestearamida, (**9**)



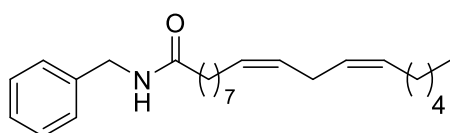
Partiendo del ácido esteárico (611 mg, 2.15 mmol) y bencilamina (230 mg, 2.15 mmol) se obtienen 506 mg de la amida **9** (rto. 63%) como sólido blanco. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN-¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, J= 7.2 Hz), 1.28-1.17 (m, 28H), 1.65 (q, 2H, J= 7.7 Hz), 2.21 (t, 2H, J= 7.2 Hz), 4.45 (d, 2H, J= 5.7 Hz), 5.70 (bs, 1H), 7.32-7.20 (m, 5H). **RMN-¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.8, 22.4, 25.5, 29.0, 29.1, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.5, 29.6, 31.7, 36.6, 43.3, 127.2, 127.5, 128.4, 138.2, 172.7.

N-benciloleicamida, (**13**)



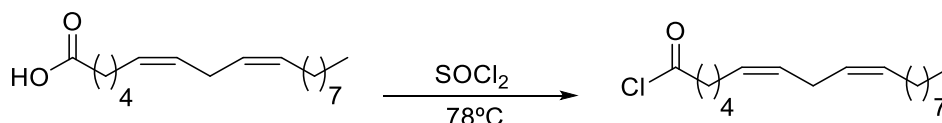
Partiendo del ácido oléico (500 mg, 1.77 mmol) y bencilamina (189 mg, 1.77 mmol) se obtienen 209 mg de la amida **13** (rto. 56%) como sólido blanco. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN-¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.83 (t, 3H, J= 7.0 Hz), 1.32-1.23 (m, 20H), 1.62 (q, 2H, J= 6.9 Hz), 2.02-1.85 (m, 4H), 2.18 (t, 2H, J= 7.2 Hz), 4.40 (d, 2H, J= 5.7 Hz), 5.37-5.26 (m, 2H), 5.70 (bs, 1H), 7.34-7.22 (m, 5H). **RMN-¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): δ 14.3, 22.8, 25.9, 27.3, 27.4, 29.3, 29.4, 29.4, 29.4, 29.5, 29.7, 29.8, 29.9, 32.0, 37.0, 43.7, 127.6, 128.0, 128.8, 129.9, 130.1, 138.6, 173.0.

N-bencilinoleicamida, (**14**)



Partiendo del ácido linoleico (400 mg, 1.42 mmol) y bencilamina (151.9 mg, 1.42 mmol) se obtienen 265 mg de la amida **14** (rto. 50%) como líquido incoloro. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN-¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J= 7.0 Hz), 1.31-1.20 (m, 14H), 1.67-1.62 (m, 2H), 2.07-2.01 (m, 4H), 2.21 (t, 2H, J= 7.7 Hz), 2.77 (t, 2H, J= 5.8 Hz), 4.44 (d, 2H, J= 5.7 Hz), 5.47-5.23 (m, 4H), 5.70 (bs, 1H), 7.32 (m, 5H). **RMN-¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): δ 14.2, 22.7, 25.8, 25.9, 27.3, 27.4, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 29.7, 31.7, 37.0, 43.7, 127.6, 128.0, 128.1, 128.2, 128.9, 130.2, 130.4, 138.6, 173.0. **HRESIMS** [M+H]⁺ *m/z* 370.3102 (calculado para C₂₅H₄₀NO 370.3104).

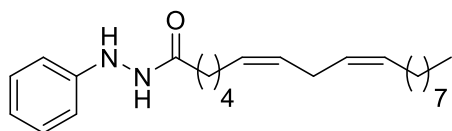
4.5.3 SÍNTESIS DE CLORURO DE LINOLEILO (**15**)



Sobre el ácido linoleico (2.00 g, 7.07 mmol), se añade SOCl₂ (1.55 mL, 35.5 mmol). La reacción se calienta a reflujo bajo agitación durante dos horas; el seguimiento de esta se

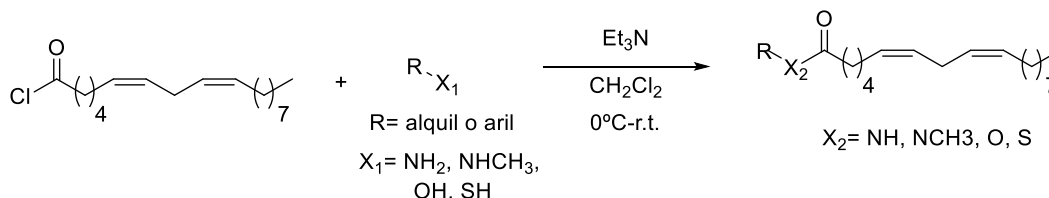
realiza mediante TLC. El exceso de cloruro de tionilo se retira mediante evaporación a presión reducida. El líquido obtenido se utilizó en la siguiente etapa sin purificación. Se obtuvieron 1.64 g. de cloruro de linoleilo (**15**) con 78% de rendimiento.

4.5.4 SÍNTESIS DE N-FENILINOLEILHIDRAZIDA (**16**)



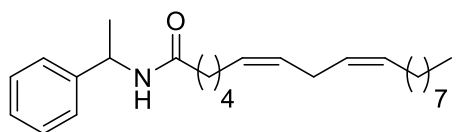
A una disolución de fenilhidrazina (215 mg, 2 mmol) en CH_2Cl_2 seco (3mL/mmol), se añade Et_3N (201 mg, 2 mmol) y se pone en agitación a 0°C . A continuación, se adiciona el cloruro de ácido **15** (500 mg, 1.66 mmol) gota a gota. Después de 10 minutos, se observa que la reacción ha finalizado mediante TLC. Se añade agua y se realiza una extracción con CH_2Cl_2 2x15 mL. La fase orgánica se seca con MgSO_4 anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. Se purifica mediante cromatografía flash con una mezcla de Hexano-Acetato de etilo (2:1), como eluyente; se obtiene la fenilhidrazida (**16**) como un líquido incoloro con un rendimiento del 70%. **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.81 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 1.40-1.22 (m, 14H), 1.72-1.59 (m, 2H), 2.08-1.97 (m, 4H), 2.18 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 2.69 (q, 2H, $J = 5.2$ Hz), 5.41-5.27 (m, 4H), 6.94-6.75 (m, 2H), 7.38-7.19 (m, 3H). **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 14.1, 22.6, 25.5, 25.6, 27.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.6, 31.5, 34.2, 113.5, 120.9, 127.9, 128.1, 129.0, 130.0, 130.2, 130.2, 148.1, 173.8

4.5.5 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LINOLEICAMIDAS, LINOLEICOÉSTERES Y LINOLEICOTIOÉSTERES



Sobre una disolución de la correspondiente amina, alcohol o tiol (1.0 eq) en CH_2Cl_2 seco (2 mL/mmol), se añade Et_3N (1.2 eq) y se pone en agitación a 0°C . A continuación, se adiciona gota a gota, el correspondiente cloruro de ácido (**15**). Transcurridos 10 minutos, se observa que la reacción ha finalizado mediante TLC. Se añade HCl (10%) y se extrae la fase acuosa 2x15 mL de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash utilizando como eluyente Hexano:AcOEt.

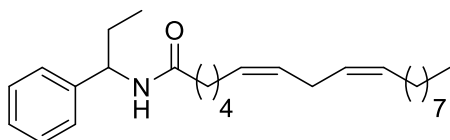
N-(1-feniletil)linololeicamida, (**22**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (593 mg, 1.99 mmol) y α -metil bencilamina (241 mg, 1.99 mmol) se obtienen 470 mg de la amida **22** (rto. 73%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz):

δ 0.89 (t, 3H, J= 7.0Hz), 1.36-1.25 (m, 14H), 1.49 (d, 3H, J= 6.9Hz), 1.65-1.56 (m, 4H), 2.04-2.00 (m, 4H), 2.16 (t, 2H, J= 7.8 Hz) 2.77 (t, 2H, J= 5.9 Hz), 5.15 (quint, 1H, J= 7.1 Hz), 5.43-5.29 (m, 4H), 5.61 (bd, 1H), 7.36-7.24 (m, 5H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.1, 21.8, 22.6, 25.7, 25.8, 27.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.6, 31.5, 36.8, 48.5, 126.2, 127.2, 127.9, 128.1, 128.6, 130.1, 130.2, 143.5, 172.3

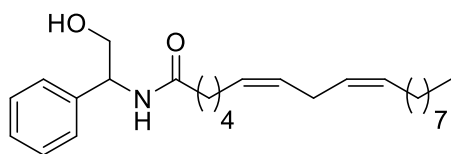
N-(1-fenilpropil)linoleicamida, (**23**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (658 mg, 2.21 mmol) y α -etil bencilamina (300 mg, 2.21 mmol) se obtienen 608 mg de la amida **23** (rto. 69%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado

con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1) **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.87 (t, 6H, J= 7.4 Hz), 1.34-1.23 (m, 14H), 1.62-1.57 (m, 4H), 1.85-1.74 (m, 2H), 2.06-1.98 (m, 3H), 2.15 (t, J= 7.8 Hz), 2.75 (t, 1H, J= 5.7 Hz), 4.87 (q, 1H, J= 7.3 Hz), 5.41-5.26 (m, 3H), 5.65 (d, 1H, J= 6.7 Hz), 7.34-7.22 (m, 5H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 10.8, 14.1, 22.6, 25.7, 25.9, 27.3, 29.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.7, 31.6, 36.9, 54.8, 126.7, 127.3, 128.0, 128.1, 128.6, 130.1, 130.3, 142.4, 172.6

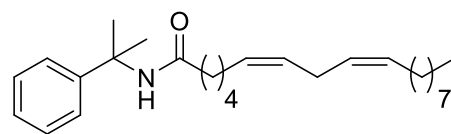
N-(2-hidroxi-1-feniletil)linoleicamida, (**24**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (593 mg, 2.18 mmol) y DL-2-fenilglicinol (300 mg, 2.18 mmol) se obtienen 535 mg de la amida **24** (rto. 77%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN- H^1**

($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J=6.9 Hz), 1.39-1.26 (m, 14H), 1.69-1.59 (m, 4H), 2.07-2.01 (m, 3H), 2.25 (t, 2H, J=7.4 Hz), 2.77 (t, 2H, J=6.9Hz), 3.91-3.87 (m, 2H), 5.07 (q, 1H, J= 6.2Hz), 5.41-5.29 (m, 3H), 6.1 (m, d, J=6.6Hz), 7.41-7.27 (m, 5H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.2, 22.7, 25.7, 25.8, 27.3, 29.3, 29.4, 29.4, 29.4, 29.7, 31.6, 36.8, 55.9, 66.5, 126.8, 127.9, 128.0, 128.2, 128.9, 130.1, 130.3, 139.3, 174.1

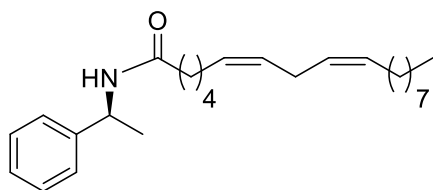
N-(2-fenilpropan-2-il)linoleicamida, (**25**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (658 mg, 2.21 mmol) y 1-metil-1-feniletilamina (300 mg, 2.21 mmol) se obtienen 704 mg de la amida **25** (rto. 80%) como líquido amarillento. El producto

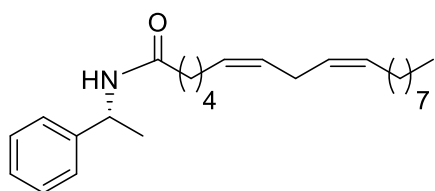
fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (7:1) Se introducen 300 mg de la amina y se obtienen 704 mg de producto (rto=80%). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J= 7.9 Hz), 1.39-1.25 (m, 14H), 1.66-1.56 (m, 4H), 1.70 (s, 6H), 2.08-2.02 (m, 3H), 2.14 (t, 2H, J= 7.4 Hz), 2.77 (t, 1H, J= 5.9 Hz), 5.39-5.29 (m, 4H), 5.66 (bs, 1H), 7.41-7.19 (m, 5H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.1, 22.6, 25.7, 25.8, 27.2, 29.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.7, 31.5, 37.3, 55.7, 124.8, 126.5, 128.0, 128.1, 128.3, 130.1, 130.2, 147.1, 172.5

(*S*)-*N*-(1-feniletil)linoleicamida, (**26**)



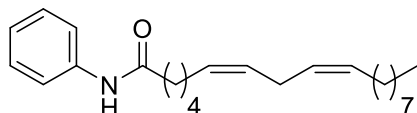
Partiendo del cloruro de linoleilo (593 mg, 1.99 mmol) y (*S*)- α -metil bencilamina (241 mg, 1.99 mmol) se obtienen 470 mg de la amida **22** (rto. 73%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J = 7.0Hz), 1.36-1.25 (m, 14H), 1.49 (d, 3H, J =6.9Hz), 1.65-1.56 (m, 4H), 2.04-2.00 (m, 4H), 2.16 (t, 2H, J =7.8Hz) 2.77 (t, 2H, J =5.9Hz), 5.15 (quint, 1H, J =7.1Hz), 5.43-5.29 (m, 4H), 5.61 (bd, 1H), 7.36-7.24 (m, 5H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.1, 21.8, 22.6, 25.7, 25.8, 27.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.6, 31.5, 36.8, 48.5, 126.2, 127.2, 127.9, 128.1, 128.6, 130.1, 130.2, 143.5, 172.3. $[\alpha]^{25}_D$ = -52.2 (c 0.1, $CHCl_3$).

(*R*)-*N*-(1-feniletil)linoleicamida, (**27**)



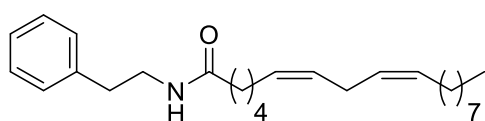
Partiendo del cloruro de linoleilo (593 mg, 1.99 mmol) y α -metil bencilamina (241 mg, 1.99 mmol) se obtienen 470 mg de la amida **22** (rto. 73 %) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J = 7.0 Hz), 1.36-1.25 (m, 14H), 1.49 (d, 3H, J = 6.9 Hz), 1.65-1.56 (m, 4H), 2.04-2.00 (m, 4H), 2.16 (t, 2H, J = 7.8 Hz) 2.77 (t, 2H, J = 5.9 Hz), 5.15 (quint, 1H, J = 7.1 Hz), 5.43-5.29 (m, 4H), 5.61 (bd, 1H), 7.36-7.24 (m, 5H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.1, 21.8, 22.6, 25.7, 25.8, 27.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.6, 31.5, 36.8, 48.5, 126.2, 127.2, 127.9, 128.1, 128.6, 130.1, 130.2, 143.5, 172.3 $[\alpha]^{25}_D$ = +52.2 (c 0.1, $CHCl_3$).

N-fenillinoleicamida, (**31**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (736 mg, 2.47 mmol) y anilina (230 mg, 2.47 mmol) se obtienen 640 mg de la amida **31** (rto. 73 %) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (3:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J = 6.8 Hz), 1.34-1.17 (m, 14H), 1.73-1.60 (m, 2H), 2.05 (q, 4H, J = 6.4 Hz), 2.35 (t, 2H, J = 7.7 Hz), 2.77 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 5.35-5.21 (m, 4H), 7.10 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 7.18 (bs, 1H), 7.31 (t, 2H, J = 8.2 Hz), 7.51 (d, 2H, J = 7.8 Hz). **RMN C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.1, 22.6, 25.6, 25.8, 27.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.6, 31.5, 37.6, 120.3, 124.1, 127.9, 128.0, 128.8, 130.0, 130.2, 138.3, 172.3

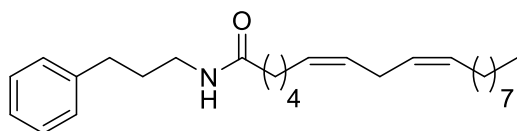
N-fenetillinoleicamida, (**32**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (736 mg, 2.47 mmol) y fenetilamina (300 mg, 2.47 mmol) se obtienen 663 mg de la amida **32** (rto. 70 %) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (4:1). **RMN- H^1**

(CDCl₃, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J= 6.9 Hz), 1.35-1.27 (m, 14H), 1.58-1.53 (m, 3H), 2.15-2.03 (m, 5H), 2.85-2.73 (m, 3H), 3.52 (q, 2H, J= 6.8 Hz), 5.46-5.32 (m, 4H), 7.35-7.18 (m, 5H). **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 14.0, 22.5, 25.6, 25.7, 27.1, 29.1, 29.2, 29.3, 29.6, 31.5, 35.6, 36.6, 40.6, 126.4, 127.9, 128.5, 128.7, 130.0, 130.1, 139.0, 173.4

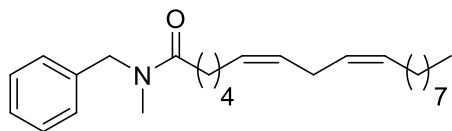
N-3-fenilpropillinoleicamida, (**33**)



Se introducen 250 mg de la amina y se obtienen 573 mg de producto (rto. 78%). Se columna con una mezcla de Hexano:Acetato de etilo (6:1) Líquido amarillo pálido.

RMN-H¹ (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J= 7.0 Hz), 1.40-1.24 (m, 14H), 1.69-1.56 (m, 3H), 1.84 (quint, 2H, J= 7.0 Hz), 2.15-2.02 (m, 5H), 2.65 (t, 2H, J= 7.8 Hz), 2.77 (t, 2H, J= 5.9 Hz), 3.29 (q, 2H, J= 6.9 Hz), 5.42-5.28 (m, 4H), 7.22-7.15 (m, 3H), 7.30-7.26 (m, 2H). **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 14.0, 22.5, 25.6, 25.8, 27.2, 29.1, 29.3, 29.3, 29.6, 31.2, 31.5, 33.3, 36.7, 39.2, 125.9, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 130.0, 130.2, 141.5, 173.4

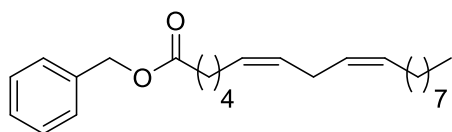
N-fenil-*N*-metil-linoleicamida, (**37**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (572 mg, 1.92 mmol) y *N*-bencilmetilamina (233 mg, 1.92 mmol) se obtienen 477 mg de la amida **31** (rto. 65%) como líquido amarillento. El producto

fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (4:1). **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J= 7.0Hz), 1.36-1.25 (m, 14H), 1.49 (d, 3H, J= 6.9 Hz), 1.65-1.56 (m, 4H), 2.04-2.00 (m, 4H), 2.16 (t, 2H, J= 7.8 Hz) 2.77 (t, 2H, J= 5.9 Hz), 2.88 (s, 3H), 4.56 (s, 2H), 5.43-5.29 (m, 4H), 5.61 (bd, 1H), 7.36-7.15 (m, 5H). **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 14.1, 21.8, 22.6, 25.7, 25.8, 27.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.6, 31.5, 36.8, 50.6, 126.2, 127.8, 127.9, 128.4, 128.6, 129.9, 130.2, 137.4, 173.3

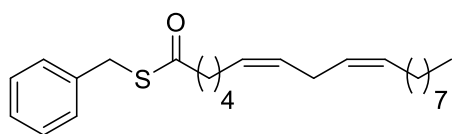
Bencil linoleato, (**38**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (581 mg, 1.94 mmol) y alcohol bencílico (200 mg, 1.94 mmol) se obtienen 640 mg del éster **38** (rto. 80%) como líquido amarillento. El producto

fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (4:1). **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.90 (t, 3H, J= 6.9 Hz), 1.38-1.27 (m, 14H), 1.70-1.60 (m, 2H), 2.11-2.01 (m, 4H), 2.36 (t, 2H, J= 7.6 Hz), 2.78 (t, 2H, J= 5.9 Hz), 5.12 (s, 2H), 5.40-5.30 (m, 4H), 7.38-7.35 (m, 5H). **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 14.1, 22.6, 25.0, 25.7, 29.1, 29.2, 29.4, 29.6, 31.6, 34.3, 66.0, 128.0, 128.1, 128.1, 128.2, 128.5, 130.0, 130.2, 136.2, 173.5 **HRESIMS** [M+Na]⁺ *m/z* 425.2633 (calculado para C₂₅H₃₂O₂Na 393.2764).

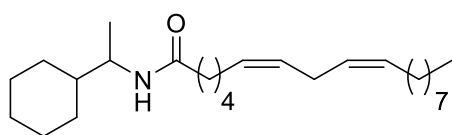
Bencil tiolinoleato, (**39**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (357 mg, 1.20 mmol) y bencil mercaptano (150 mg, 1.20 mmol) se obtienen 355 mg del tioéster **39** (rto. 76%) como líquido amarillento. El producto

fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (4:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, J = 6.9 Hz), 1.29 (m, 14H), 1.64 (m, 2H), 2.02 (m, 4H), 2.54 (t, 2H, J = 7.7 Hz), 2.76 (t, 2H, J = 5.9 Hz), 4.10 (s, 2H), 5.38-5.25 (m, 4H), 7.33-7.23 (m, 5H) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.1, 22.6, 25.6, 25.7, 27.2, 27.3, 28.9, 29.1, 29.2, 29.4, 29.6, 31.6, 33.1, 43.8, 127.2, 128.0, 128.1, 128.6, 128.8, 130.0, 130.2, 137.8, 198.6

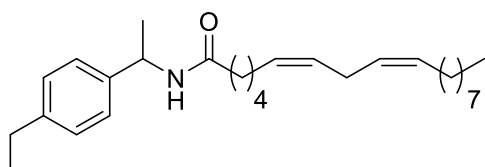
N-(1-ciclohexetil)linoleicamida (**60**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (187 mg, 0.63 mmol) y ciclohexiletilamina (80 mg, 0.63 mmol) se obtienen 178 mg de la amida **60** (rto. 73 %) como líquido amarillento. El producto

fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (5:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, J = 6.9Hz), 1.29 (m, 14H), 1.64 (m, 2H), 2.02 (m, 4H), 2.54 (t, 2H, J = 7.7Hz), 2.76 (t, 2H, J = 5.9 Hz), 4.10 (s, 2H), 5.38-5.25 (m, 4H), 7.33-7.23 (m, 5H) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.2, 18.2, 22.7, 25.8, 26.0, 26.3, 26.3, 26.6, 27.3, 29.2, 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.7, 31.7, 37.3, 43.2, 49.3, 128.1, 128.2, 130.2, 130.3, 172.4

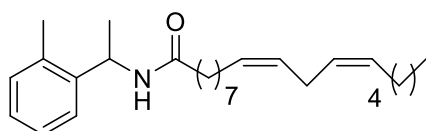
N-(1-(4-etilfenil)etil)linoleicamida (**61**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (159 mg, 0.53 mmol) y 1-(4-etilfenil)etanamina (80 mg, 0.53 mmol) se obtienen 157 mg de la amida **61** (rto. 73%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla

Hexano-AcOEt (4:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J = 6.8 Hz), 1.23 (t, 3H, J = 7.6 Hz), 1.40-1.26 (m, 14H), 1.47 (d, 3H, J = 6.9 Hz), 1.68-1.59 (m, 2H), 2.06 (m, 4H), 2.15 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 2.63 (q, 2H, J = 7.6 Hz), 2.77 (t, 2H, J = 5.7 Hz), 2.12 (quint, 1H, J = 7.0 Hz), 5.47-5.28 (m, 4H), 5.63 (bd, 1H, J = 7.9 Hz), 7.17 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.25 (d, 2H, J = 8.1 Hz). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): 13.8, 15.2, 21.3, 22.3, 25.4, 25.4, 26.9, 28.2, 28.9, 29.0, 29.1, 29.3, 31.2, 36.7, 48.0, 126.0, 127.6, 127.8, 127.8, 129.8, 130.0, 140.2, 143.1, 171.8

N-(1-(*o*-tolil)etil)linoleicamida (**62**)

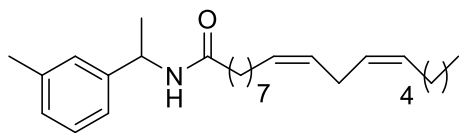


Partiendo del cloruro de linoleilo (176 mg, 0.59 mmol) y *o*-toliletilamina (80 mg, 0.59 mmol) se obtienen 162 mg de la amida **62** (rto. 77%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una

mezcla Hexano-AcOEt (7:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.97 (t, 3H, J = 6.7 Hz), 1.46-1.34 (m, 14H), 1.55 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 1.73-1.66 (m, 2H), 2.16-2.10 (m, 2H), 2.22

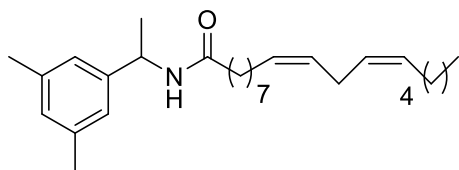
(t, 2H, J = 8.1 Hz), 2.46 (s, 3H), 2.85 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 5.52-5.36 (m, 4H), 5.69 (bd, 1H, J = 8.0 Hz), 7.40-7.22 (m, 4H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): 14.2, 19.3, 21.2, 22.7, 25.8, 25.9, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 31.7, 36.9, 45.3, 124.8, 126.4, 127.4, 128.0, 128.2, 130.2, 130.4, 130.9, 136.2, 141.3, 172.1

N-(1-(*m*-tolil)etil)linoleicamida (**63**)



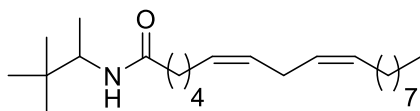
Partiendo del cloruro de linoleilo (176 mg, 0.59 mmol) y *m*-toliletilamina (80 mg, 0.59 mmol) se obtienen 162 mg de la amida **63** (rto. 77%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (7:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J = 6.9 Hz), 1.41-1.25 (m, 14H), 1.45 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 1.63 (m, 3H), 2.08-2.01 (m, 4H), 2.16 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 2.35 (s, 3H), 2.77 (t, 2H, J = 5.9 Hz), 5.10 (quint, 1H, J = 7.2 Hz), 5.43-5.28 (m, 4H), 5.60 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 7.26-7.06 (m, 4H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): 14.2, 21.6, 21.9, 22.7, 25.8, 25.9, 27.4, 29.3, 29.4, 29.5, 29.8, 31.7, 37.1, 48.7, 123.3, 127.2, 128.1, 128.2, 128.2, 128.7, 130.2, 130.4, 138.5, 143.4, 172. **HRESIMS** $[M+H]^+$ m/z 398.3354 (calculado para $C_{27}H_{44}NO$ 398.3359).

N-(1-(3,5-dimetilfenil)etil)linoleicamida (**64**)



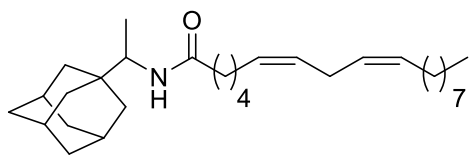
Partiendo del cloruro de linoleilo (239 mg, 0.80 mmol) y α ,3,5-trimetilbencenometanamina (120 mg, 0.80 mmol) se obtienen 162 mg de la amida **64** (rto. 75 %) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (7:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, J = 6.7 Hz), 1.41-1.25 (m, 14H), 1.45 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 1.63 (m, 2H), 2.08-2.01 (m, 4H), 2.15 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 2.24 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.77 (t, 2H, J = 5.9 Hz), 5.10 (quint, 1H, J = 7.2 Hz), 5.43-5.28 (m, 4H), 5.60 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 7.12-7.03 (m, 3H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): 14.2, 19.5, 20.0, 21.9, 22.7, 25.8, 25.9, 27.4, 29.3, 29.4, 29.5, 29.8, 31.7, 37.1, 48.7, 123.6, 127.8, 128.0, 128.2, 130.0, 130.2, 130.4, 137.0, 140.9, 172.1. **HRESIMS** $[M+H]^+$ m/z 412.3566 (calculado para $C_{28}H_{46}NO$ 412.3574).

N-(3,3-dimetilbuan-2-il)linoleicamida (**65**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (294 mg, 0.98 mmol) y 2-amino-3,3-dimetilbutano (100 mg, 0.98 mmol) se obtienen 310 mg de la amida **65** (rto. 77%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (7:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.83 (s, 3H), 0.83 (t, 9H, J = 8.0 Hz), 0.98 (d, 3H, J = 7.8 Hz), 1.24 (m, 14H), 1.57 (m, 2H), 1.98 (q, 4H, J = 6.4 Hz), 2.11 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 2.70 (t, 2H, J = 5.9 Hz), 3.83 (m, 1H), 5.30 (m, 4H), 5.52 (bd, 1H, J = 9.5 Hz). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): 14.0, 16.2, 22.6, 25.6, 26.0, 26.2, 27.2, 29.3, 29.3, 29.3, 29.6, 31.5, 34.1, 37.1, 52.4, 127.9, 128.0, 130.0, 130.1, 172.3.

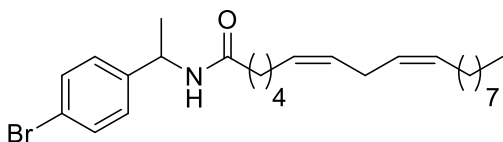
N-(1-(adamantil)etil)linoleicamida (**66**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (250 mg, 0.84 mmol) y 2-amino-3,3-dimetilbutano (150 mg, 0.84 mmol) se obtienen 240 mg de la amida **66** (rto. 65%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla

Hexano-AcOEt (7:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 80.88 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.00 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.42-1.25 (m, 14H), 1.60-1.40 (m, 6H), 1.75-1.57 (m, 8H), 2.10-1.93 (m, 6H), 2.16 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz), 2.77 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 3.77-3.67 (m, 1H), 5.42-5.22 (m, 4H) **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): 14.2, 14.8, 22.7, 25.8, 26.1, 27.3, 28.5, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 29.8, 31.7, 35.9, 37.2, 37.4, 38.6, 52.8, 128.1, 128.2, 130.2, 130.4, 172.5

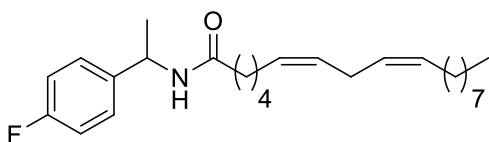
N-(1-(4-bromofenil)etil)linoleicamida (**67**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (201 mg, 0.67 mmol) y 4-bromo- α -metilbencilamina (135 mg, 0.67 mmol) se obtienen 255 mg de la amida **67** (rto. 82%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla

Hexano-AcOEt (4:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 80.87 (t, 3H, $J = 4.9$ Hz), 1.42-1.25 (m, 14H), 1.45 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.56-1.61 (m, 2H), 2.05 (q, 4H, $J = 6.4$ Hz), 2.12 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 2.75 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 5.00 (quint, 1H, $J = 7.3$ Hz), 5.42-5.32 (m, 4H), 6.45 (bd, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.12 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.38 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz) **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): 14.1, 21.7, 22.6, 25.6, 25.8, 27.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.3, 29.6, 31.5, 36.6, 48.0, 120.9, 128.0, 127.9, 128.1, 130.0, 130.2, 131.5, 142.8, 172.4

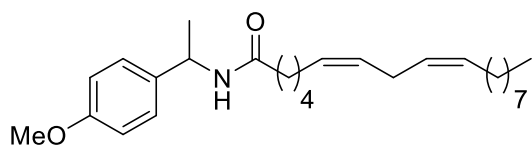
N-(1-(4-fluorofenil)etil)linoleicamida (**68**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (246 mg, 0.82 mmol) y 4-fluoro- α -metilbencilamina (115 mg, 0.82 mmol) se obtienen 255 mg de la amida **68** (rto. 79%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt

(3:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 80.89 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.42-1.25 (m, 14H), 1.45 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.54-1.61 (m, 2H), 2.04-2.10 (m, 4H), 2.16 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 2.16 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 2.77 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz), 5.11 (quint, 1H, $J = 7.2$ Hz), 5.42-5.34 (m, 4H), 5.92 (bd, 1H), 6.9-7.1 (m, 2H), 7.26-7.36 (m, 2H) **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): 14.1, 21.9, 22.7, 25.7, 25.8, 27.3, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.7, 31.6, 36.9, 48.0, 115.5 (d, $J = 79.9$ Hz), 127.9 (d, $J = 8.0$ Hz), 128.1 (d, $J = 12.5$ Hz), 130.2 (d, $J = 16.0$ Hz), 139.3 (d, $J = 3.1$ Hz), 162.1 (d, $J = 245.4$ Hz), 172.3 **RMN- ^{19}F** (CDCl_3 , 75 MHz): δ -115.5

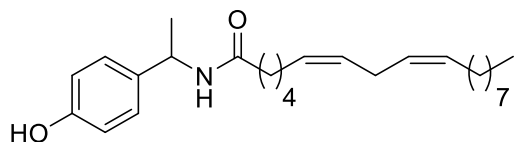
N-(1-(4-metoxifenil)etil)linoleicamida (**69**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (197 mg, 0.66 mmol) y 1-(4-metoxifenil)-etanamina (100 mg, 0.66 mmol) se obtienen 226 mg de la amida **69** (rto. 83%) como líquido amarillento.

RMN- H^1 ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 80.87 (t, 3H, J = 7.0 Hz), 1.40-1.27 (m, 14H), 1.42 (d, 3H, J = 7.0 Hz), 1.54-1.61 (m, 2H), 2.02-2.10 (m, 4H), 2.15 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 2.75 (t, 2H, J = 5.9 Hz), 3.74 (s, 3H), 5.05 (quint, 1H, J = 10.7 Hz), 5.44-5.32 (m, 4H), 6.12 (bd, 1H, J = 7.9 Hz), 6.82 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.20 (d, 2H, J = 8.7 Hz) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): 14.0, 21.7, 22.5, 25.6, 25.8, 27.2, 29.1, 29.3, 29.3, 29.3, 29.6, 31.5, 36.8, 47.9, 55.2, 113.9, 127.3, 130.0, 130.2, 135.6, 158.7, 172.2

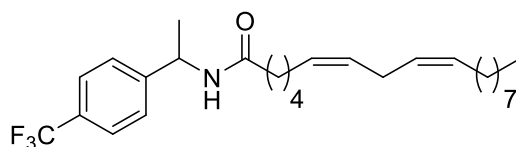
N-(1-(4-hidroxifenil)etil)linoleicamida (**70**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (271 mg, 0.91 mmol) y 1-(*p*-hidroxifenil)etilamina (125 mg, 0.91 mmol) se obtienen 251 mg de la amida **70** (rto. 69%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla

Hexano-AcOEt (4:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 80.89 (t, 3H, J = 6.8 Hz), 1.44-4.17 (m, 14H), 1.47 (d, 3H, J = 6.9 Hz), 1.66-1.58 (m, 2H), 1.79-1.70 (m, 2H), 2.11-2.02 (m, 4H), 2.15 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 2.54 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 2.82-2.74 (m, 4H), 5.16 (quint, 1H, J = 7.3 Hz), 5.44-5.28 (m, 4H), 5.61 (bd, 1H, J = 7.9 Hz), 7.03 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.32 (d, 2H, J = 8.6 Hz) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): 14.2, 22.7, 25.8, 27.3, 29.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 31.7, 121.9, 127.5, 128.1, 128.2, 130.2, 130.4, 140.8, 150.0, 172.2

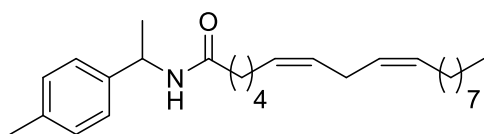
N-(1-(4-trifluorofenil)etil)linoleicamida (**71**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (141 mg, 0.47 mmol) y 1-(4-trifluorometilfenil)etilamina (90 mg, 0.47 mmol) se obtienen 156 mg de la amida **71** (rto. 73%) como líquido amarillento.

El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (6:1). Se introducen 90 mg de la amina y se obtienen 156 mg de producto (rto 73%). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz), 1.25-1.40 (m, 14H), 1.48 (d, 3H, J = 6.9 Hz), 1.66-1.58 (m, 2H), 2.01-2.08 (m, 4H), 2.18 (t, 3H, J = 8.1 Hz), 2.77 (t, 2H, J = 6.2 Hz), 5.17 (quint, 1H, J = 7.2 Hz), 5.27-5.43 (m, 4H), 5.74 (bd, 1H, J = 7.1 Hz), 7.41 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.58 (d, 2H, J = 8.1 Hz) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): 14.2, 22.0, 22.7, 25.8, 25.8, 27.3, 27.3, 25.8, 25.8, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 31.7, 36.9, 48.5, 175.7 (q, J = 3.7 Hz), 126.6, 128.0, 128.2, 130.1, 130.1, 130.4

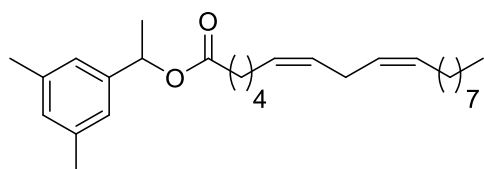
N-(1-(*p*-tolilfenil)etil)linoleicamida (**72**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (289 mg, 0.97 mmol) y 1-(4-metilfenil)etilamina (130 mg, 0.97 mmol) se obtienen 331 mg de la amida **72** (rto. 80%) como líquido amarillento. El producto

fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (6:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.90 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.25-1.40 (m, 14H), 1.45 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.66-1.58 (m, 2H), 2.01-2.08 (m, 4H), 2.15 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 2.32 (s, 3H), 2.78 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 5.10 (quint, 1H, $J = 7.0$ Hz), 5.27-5.43 (m, 4H), 6.02 (bd, $J = 7.8$ Hz), 7.12 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.20 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz) **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): 14.1, 21.04, 21.8, 22.6, 25.7, 25.8, 27.2, 29.2, 29.3, 29.31, 29.4, 31.6, 36.8, 48.3, 126.1, 128.0, 128.1, 129.3, 130.1, 130.2, 136.8, 140.5, 172.2.

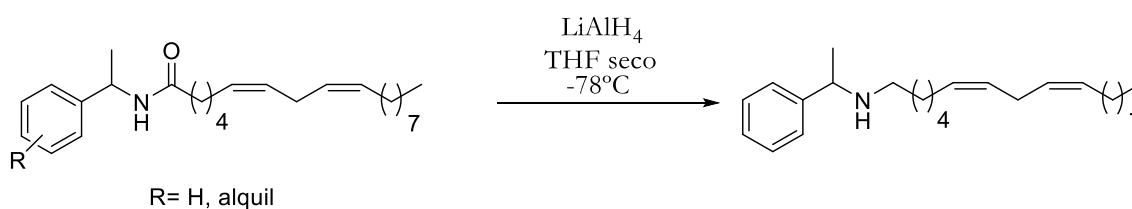
3,5-dimetilfeniletíl linoleato, (**38**)



Partiendo del cloruro de linoleilo (139 mg, 0.46 mmol) y α ,3,5-timetil-bencenometanol (70 mg, 0.46 mmol) se obtienen 128 mg del éster **38** (rto. 80%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla

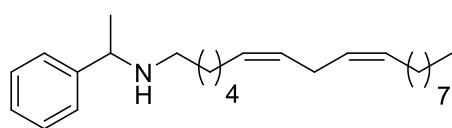
Hexano-AcOEt (6:1). Se introducen 70 mg de alcohol **74** y se obtienen 128 mg de producto (rto. 67%). Se columna con una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (8:1) Líquido amarillo pálido. **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.41-1.25 (m, 14H), 1.45 (d, 2H, $J = 6.9$ Hz), 1.63 (m, 2H), 2.08-2.01 (m, 4H), 2.15 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz), 2.26 (s, 6H), 2.77 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 4.08 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz), 5.10 (quint, 1H, $J = 7.2$ Hz), 5.43-5.28 (m, 4H), 5.60 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.92 (s, 2H), 6.84 (s, 1H) **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): 14.2, 19.5, 20.0, 21.9, 22.7, 25.8, 25.9, 27.4, 29.3, 29.4, 29.5, 29.8, 31.7, 37.1, 72.1, 123.8, 127.8, 128.0, 129.5, 130.0, 130.2, 130.4, 138.2, 141.8, 173.1

4.5.6 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA REDUCCIÓN DE AMIDAS



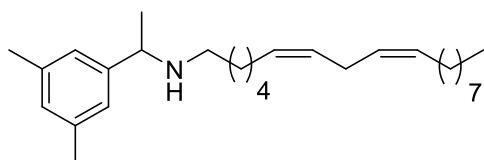
Se adiciona LiAlH_4 (5 eq) a un matraz con THF seco a -78°C , y posteriormente se adiciona la correspondiente amida (1eq), gota a gota, disuelta en THF seco. Se mantiene la agitación durante 12 h. Una vez finalizada la reacción, se adiciona Na_2SO_4 hidratado y se deja reaccionar durante 15 minutos hasta que deja de observarse la formación de hidrógeno. Se filtra la disolución y se elimina el disolvente a presión reducida; el crudo de la reacción se purifica mediante cromatografía flash utilizando como eluyente Hexano-AcOEt.

(9Z,12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dien-1 amina (**40**)



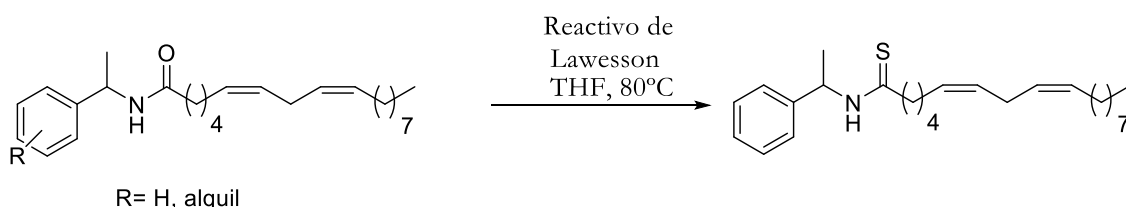
Partiendo la amida **14** (150 mg, 0.40 mmol) y LiAlH_4 (76 mg, 2 mmol), se obtienen 119 mg la amina **40** (rto. 83%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (1:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.85 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.33-1.20 (m, 14H), 1.32 (d, 3H, $J = 10.4$ Hz), 2.06-1.96 (m, 4H), 2.49-2.34 (m, 2H), 2.73 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 3.71 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz), 5.41-5.26 (m, 4H), 7.16-7.28 (m, 5H) **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 14.2, 22.7, 24.4, 25.8, 27.3, 27.3, 27.5, 29.4, 29.5, 29.6, 29.8, 30.4, 31.7, 48.0, 58.5, 126.7, 126.9, 128.1, 128.1, 128.5, 130.2, 130.3, 146.0. **HRESIMS** $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 370.3468 (calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}$ 370.3468).

(9Z,12Z)-N-(1-(3,5-dimetilfenil)etil)octadeca-9,12-dien-1 amina (**76**)



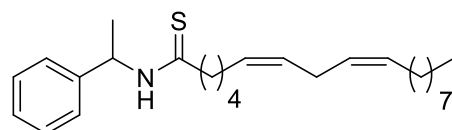
Partiendo la amida **64** (80 mg, 0.20 mmol) y LiAlH_4 (38 mg, 1 mmol), se obtienen 59 mg la amina **76** (rto. 77%) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (1:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.85 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.33-1.20 (m, 14H), 1.32 (d, 3H, $J = 10.4$ Hz), 2.06-1.96 (m, 4H), 2.49-2.34 (m, 2H), 2.73 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 3.71 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz), 5.41-5.26 (m, 4H), 6.91 (s, 1H), 7.00 (s, 2H) **RMN- ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz): δ 14.2, 21.5, 22.7, 25.8, 27.3, 27.4, 29.4, 29.5, 29.6, 29.8, 30.4, 31.7, 48.0, 58.7, 124.8, 126.9, 128.1, 128.1, 130.1, 130.3, 130.4, 138.3

4.5.7 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE TIOAMIDAS



Sobre una disolución de la correspondiente amida (1.0 eq) en THF seco, se añade el reactivo de Lawesson (1.5 eq) y se pone en agitación a reflujo durante 12 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía flash utilizando como eluyente Hexano-AcOEt.

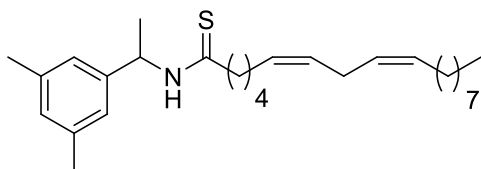
(9Z,12Z)-N-(1-feniletíl)octadeca-9,12-dienotiamida (**41**)



Partiendo la amida **14** (130 mg, 0.34 mmol) y el reactivo de lawesson (206 mg, 0.51 mmol), se obtienen 135mg de la tioamida **41** (rto. 99 %) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt (15:1). **RMN- ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.83 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.32-1.18(m, 14H), 1.50 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.72-1.62 (m, 2H),

2.03-1.93 (m, 2H), 2.54 (t, 2H, J= 7.8 Hz), 2.71 (t, 2H, J= 5.9 Hz), 5.36-5.25 (m, 4H), 5.70 (quint, 1H, J= 7.1 Hz), 7.27-7.17 (m, 5H), 7.78 (bd, 1H, J= 8.0 Hz). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.0, 19.9, 22.4, 25.5, 27.1, 28.7, 29.0, 29.1, 29.2, 29.4, 29.5, 31.4, 47.0, 54.2, 126.4, 127.5, 127.8, 127.9, 128.6, 129.8, 130.0, 141.3, 204.2

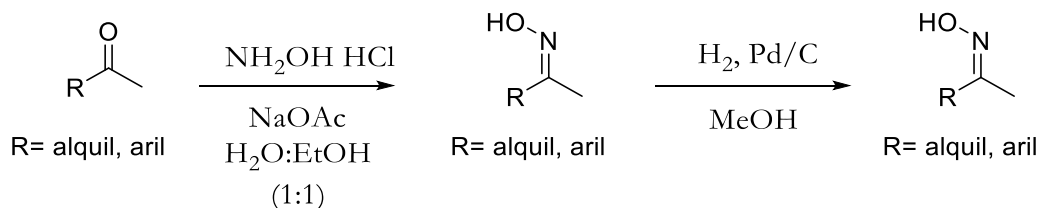
(9Z, 12Z)-N-(1-(3,5-dimetilfenil)etil)octadeca-9,12-dienotiamida (**77**)



Partiendo la amida **64** (70 mg, 0.17 mmol) y el reactivo de laweson (103 mg, 0.25 mmol), se obtienen 62mg de la tioamida **77** (rto. 93 %) como líquido amarillento. El producto fue cromatografiado con una mezcla Hexano-AcOEt

(15:1). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.83 (t, 3H, J= 6.9 Hz), 1.32-1.18(m, 14H), 1.50 (d, 3H, J= 6.9 Hz), 1.72-1.62 (m, 2H), 2.03-1.93 (m, 2H), 2.54 (t, 2H, J= 7.8 Hz), 2.71 (t, 2H, J= 5.9 Hz), 5.36-5.25 (m, 4H), 5.70 (quint, 1H, J= 7.1 Hz), 6.95 (s, 2H), 7.11 (s, 1H) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 14.0, 19.9, 22.4, 25.5, 27.1, 28.7, 29.0, 29.1, 29.2, 29.4, 29.5, 31.4, 47.0, 54.2, 124.5, 128.0, 128.2, 129.6, 130.1, 130.4, 138.6, 138.9, 141.4, 204.2

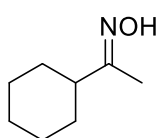
4.5.8 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE AMINAS



A una disolución de acetato sódico (1.5 eq) e hidrocloreuro de hidroxilamina (1.5 eq) en EtOH:H₂O (1:1), se le añadió la correspondiente cetona (1 eq) a temperatura ambiente. Se mantiene la reacción en agitación a reflujo durante 12h, se elimina el EtOH mediante evaporación a presión reducida y se mantiene la mezcla de reacción a 0°C, hasta la aparición de un precipitado. La oxima precipitada se filtra y se lava con una mezcla de H₂O:EtOH (3:1) enfriada a 0°C. El producto obtenido es utilizado en la siguiente etapa sin necesidad de purificación.

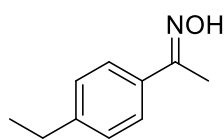
A una disolución de la oxima (1 eq) en MeOH y mediante agitación a temperatura ambiente, se le añade Pd/C (10% moles). Se mantiene la reacción en agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno 3h. Una vez observada la finalización de la reacción mediante TLC, se filtra la reacción a través de celita. Se elimina el metanol mediante evaporación a presión reducida, dando lugar a la correspondiente amina.

1-Ciclohexitanona oxima (**42**)



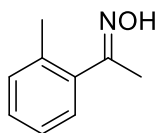
Se introducen 200 mg de cetona y se obtienen 188 mg de producto (rto. 84%). Sólido blanco. **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.36-1.10 (m, 5H), 1.84-1.61 (m, 5H), 1.85 (s, 3H), 2.13 (m, 1H), 9.47 (bs, 1H) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 12.0, 26.0, 26.1, 29.9, 44.6, 161.8

4'-etilacetofenona oxima (43)



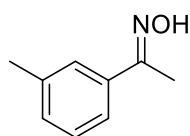
Se introducen 120 mg de cetona y se obtienen 112 mg de producto (rto. 73%). Sólido blanco. **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.18 (t, 3H, J= 7.2 Hz), 2.23 (s, 3H), 2.72 (q, 2H, J= 7.2 Hz), 7.31 (d, 2H, J= 6.9 Hz), 7.75 (d, 2H, J= 6.9 Hz) **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 14.5, 18.36, 28.2, 127.0, 127.8, 138.8, 146.6, 157.2

2'-metilacetofenona oxima (44)



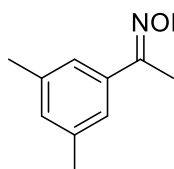
Se introducen 230 mg de cetona y se obtienen 171 mg de producto (rto. 67%). Sólido blanco. **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 2.27 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 7.46-7.14 (m, 4H) **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 15.9, 20.1, 125.9, 128.2, 128.6, 130.7, 135.7, 137.4, 158.1

3'-metilacetofenona oxima (45)



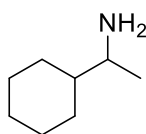
Se introducen 300 mg de cetona y se obtienen 256 mg de producto (rto. 77%). Sólido blanco. **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 2.25(s, 3H), 2.38 (s, 3H), 7.21 (m, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.41 (m, 1H), 8.08 (s, 1H) **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 12.4, 21.4, 123.2, 126.7, 128.4, 130.0, 136.4, 138.1, 155.2

3',5'-dimetilacetofenona oxima (46)



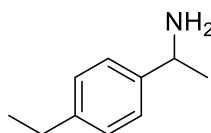
Se introducen 270 mg de cetona y se obtienen 297 mg de producto (rto. 82%). Sólido blanco. **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 2.20(s, 3H), 2.24(s, 3H), 2.41 (s, 3H), 7.64 (bs, 2H), 7.10 (bs, 1H) **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.7, 21.6, 126.2, 133.2, 133.6, 138.4, 155.2

α-metilciclohexanometanamina (47)



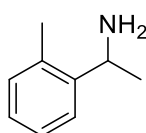
Se introducen 150 mg de oxima y se obtienen 105 mg de producto (rto. 78%). Líquido incoloro. **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.80-1.25 (m, 8H), 0.98 (d, 3H), 1.55-1.78 (m, 5H), 2.60 (m, 1H) **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.4, 25.8, 26.0, 31.5, 48.3, 63.2

4-etil-α-metilbencenometanamina (48)



Se introducen 100 mg de oxima y se obtienen 77 mg de producto (rto. 85%). Líquido incoloro. **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.21 (t, 3H, J= 7.6 Hz), 1.45 (d, 3H, J= 6.6 Hz), 2.61 (q, 2H, J= 7.4 Hz), 4.17-4.08 (m, 1H), 4.66 (bs, 1H), 7.15 (d, 2H, J= 6.9 Hz), 7.26 (d, 2H, J= 6.9 Hz) **RMN-C¹³** (CDCl₃, 75 MHz): δ 14.5, 25.6, 28.4, 51.3, 125.3, 127.3, 142.3, 145.1

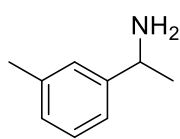
α,2-dimetilbencenometanamina (49)



Se introducen 150 mg de oxima y se obtienen 109 mg de producto (rto. 85%). Líquido incoloro. **RMN-H¹** (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.48 (d, 3H,

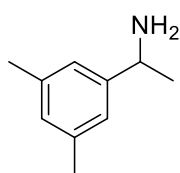
$J = 6.6$ Hz), 1.85 (bs, 2H), 2.45 (s, 3H), 4.17 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz), 7.34-7.12 (m, 5H). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 21.5, 25.7, 51.4, 122.8, 126.5, 127.7, 128.5, 138.2, 147.8

a,3-dimetilbencenometamina (**50**)



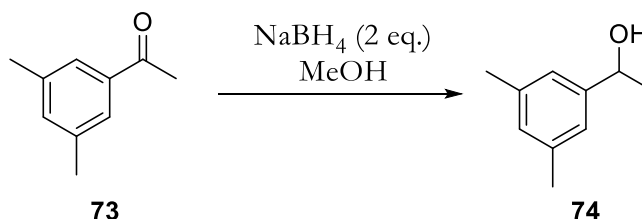
Se introducen 250 mg de oxima y se obtienen 165 mg de producto (rto. 73%). Líquido incoloro. **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.37 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz), 1.99 (bs, 2H), 2.36 (s, 3H), 4.36 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz), 7.26-7.10 (m, 3H), 7.48 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz). **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 21.7, 25.2, 51.8, 123.9, 126.7, 127.0, 128.4, 138.2, 143.4

a,3,5-trimetilbencenometamina (**51**)



Se introducen 200 mg de oxima y se obtienen 158 mg de producto (Rto=87%). Líquido incoloro. **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.27 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz), 1.83 (bs, 2H), 2.20 (s, 6H), 4.17 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz), 7.09 (bs, 2H), 7.31 (bs, 1H) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 21.9, 25.8, 52.0, 123.3, 128.9, 127.0, 138.1, 143.3

4.5.9 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL ALCOHOL **74**



A una disolución de la cetona **73** (200 mg, 1 eq.) en metanol y mediante agitación a $0^\circ C$, se adiciona $NaBH_4$ (2 eq.) lentamente, y se mantiene en agitación durante 24 h en un baño de hielo. Una vez observada la finalización de la reacción mediante TLC, se añade agua y unas gotas de HCl concentrado. Se elimina el disolvente mediante evaporación a presión reducida y el residuo resultante se columna mediante cromatografía flash con una mezcla Hexano:AcOEt (3:2). Se obtiene el alcohol **74** como líquido incoloro, con un rendimiento del 67% (136 mg). **RMN- H^1** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.49 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz), 2.33 (s, 6H), 4.82 (q, 1H, $J = 6.4$ Hz), 6.93 (s, 1H), 7.00 (s, 2H) **RMN- C^{13}** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 21.4, 25.2, 70.5, 123.3, 129.2, 138.2, 146.0.

4.5.10 TÉCNICAS GENERALES BIOLÓGICAS

Ensayo de actividad citotóxica en THP-1

Las células THP-1 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo e incubadas, durante una noche, en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 . Posteriormente, las células fueron tratadas con los compuestos ensayados a la concentración indicada y con DMSO como control negativo durante 72 h.

Ensayo MTT en THP-1

Una disolución de MTT (50 μ L, 7 mg/mL en PBS) fue añadida a cada pocillo y se incubaron las placas durante 2 h adicionales. Después, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 100 μ L de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazan. La absorbancia fue medida a 590 nm, utilizando un lector de placas espectrofotométrico ELISA (SpectraMax® i3, Molecular Devices, CA, USA). Las muestras fueron consideradas no tóxicas cuando la viabilidad celular para las células de THP-1 era $\geq 90\%$.

Ensayo de inhibición de TNF- α

Las células THP-1 (5x10⁴ células/pocillo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas durante 12 h. Las células fueron después pretratadas con varias concentraciones de los compuestos durante 2 h., antes de estimularlas con LPS (10 ng/mL) durante 12 h. Los sobrenadantes fueron posteriormente recogidos y la expresión de TNF- α fue medida utilizando un kit de ensayo de enzima-inmunoabsorbente (ELISA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Diacclone Company, Besancon, France). La absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas espectrofotométrico ELISA (Anthos 2020, Version 2.0.5, Biochrom Ltd., UK). El porcentaje de inhibición TNF- α fue calculado de la relación entre la cantidad de TNF- α segregada por las células tratadas (μ M) y la línea base de secreción de TNF- α (pg/mL). La dexametasona (Sigma Aldrich; 50-02-2) fue utilizada como control positivo (1 μ g/mL). Los resultados fueron normalizados con el DMSO como control negativo.